



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Matic KOSTANJŠEK

**RAZLIČNE UPORABE SISTEMA CRISPR/CAS9,
TRENUTNE OMEJITVE IN OBETI ZA PRIHODNOST**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Matic KOSTANJŠEK

**RAZLIČNE UPORABE SISTEMA CRISPR/CAS9, TRENUTNE
OMEJITVE IN OBETI ZA PRIHODNOST**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**APPLICATIONS OF CRISPR/CAS9 SYSTEM, CURRENT
LIMITATIONS AND FUTURE OUTLOOK**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2019

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Ireno Oven.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Irena OVEN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predstavitve: 29.5.2019

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 601.4:577.21:602.62/.64:602.68(043.2)
KG	biotehnologija, CRISPR/Cas9, genski inženiring, dCas9
AV	KOSTANJŠEK, Matic
SA	OVEN, Irena (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2019
IN	RAZLIČNE UPORABE SISTEMA CRISPR/CAS9, TRENUTNE OMEJITVE IN OBETI ZA PRIHODNOST
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VIII, 22 str., 6 pregl., 10 sl., 72 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Sistem CRISPR/Cas9 je bakterijski način obrambe proti virusom. V zadnjih letih je postal najbolj uporabljena metoda za spreminjanje genomov. Sistem z enojno vodečo (sgRNA) specifično prepozna točno določena zaporedja na genomu, kamor se nato veže protein Cas9 z nukleazno aktivnostjo. Zaradi enostavnosti spreminjanja zaporedja sgRNA in s tem tarče v genomu, ima sistem veliko aplikacij na številnih področjih, od spreminjanja genoma rastlin za produkcijo terapevtskih proteinov, mikrobne biotehnologije, sintetične biologije, do direktnih kliničnih aplikacij pri ljudeh. Poleg dobro poznanih aplikacij sistema, s katerimi se genom spremeni, pa se je razvilo tudi ogromno drugih aplikacij. Sistem z deaktiviranim proteinom Cas9 se tako danes uporablja tudi za regulacijo prepisovanja genov ali spreminjanje epigenoma. Kljub širokemu spektru obstoječih aplikacij pa obstajajo omejitve, kot so netarčne mutacije ali težave z dostavo, ki zavirajo še širšo uporabo sistema. Pojavilo se je že veliko rešitev za te ovire. V zadnjem času je bilo izdelanih nekaj izboljšanih proteinov Cas9, prav tako pa je bilo razvitih več novih sistemov, s pomočjo katerih bi lahko težave omejili. Poleg tega je zelo pomembno predvideti in kasneje tudi validirati potencialne neželene učinke v obliki netarčnih mutacij.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDK 601.4:577.21:602.62/.64:602.68(043.2)

CX biotechnology, CRISPR-Cas9, genetic engineering, dCas9

AU KOSTANJŠEK, Matic

AA OVEN, Irena (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology

PY 2019

TI APPLICATIONS OF CRISPR/CAS9 SYSTEM, CURRENT LIMITATIONS AND FUTURE OUTLOOK

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO VIII, 22 p., 6 tab., 10 fig., 72 ref.

LA sl

AL sl/en

AB CRISPR/Cas9 is a bacterial immune system against invading viruses. Because altering the sgRNA sequence, which binds to the target in the genome is so facile, CRISPR/Cas9 has become a method of choice in the fields such as genetic engineering, microbial biotechnology or synthetic biology. Furthermore, the system has a great potential in clinical applications for correcting disease-causing genes in somatic cells. The potential of CRISPR/Cas9 extends further than gene editing via NHEJ or HDR. Applications of deactivated Cas9 protein with a fused effector domain have seen a surge in popularity in recent years. With them, it is possible to alter gene regulation, cause epigenetic remodeling or visualize certain loci of interest. Although there is a wide range of potential uses of the system, it is currently coping with some limitations. Such limitations are off-target mutations or problems with delivery. Recently, new solutions have emerged for those challenges, such as engineered Cas9 proteins, modifications in sgRNA and some new systems for higher specificity. It is crucial to determine potential off target sites in both *in silico* and *in vivo* or *in vitro* systems.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VI
	KAZALO SLIK	VI
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1	UVOD	1
2	MEHANIZMI DELOVANJA	2
2.1	KOMPLEKS tracrRNA:crRNA	2
2.2	PAM IN VEZAVA NA DNA	2
2.3	CEPITEV DNA VERIGE	3
3	APLIKACIJE	3
3.1	UPORABA DEAKTIVIRANEGA Cas9 PROTEINA	3
3.1.1	Aktivacija genov	3
3.1.2	Utišanje genov	5
3.1.3	Epigenetsko remodeliranje	5
3.1.4	Urejanje posameznih baz	6
4	DOSTAVA	8
4.1	VIRUSNI VEKTORJI	9
4.2	METODE NEVIRUSNEGA VNOSA VEKTORJA	9
4.2.1	Mikroinjiciranje	9
4.2.2	Elektroporacija	10
4.2.3	Hidrodinamski vnos	10
4.2.4	Liposomi	10
4.2.5	Lipopleksi	10
4.2.6	Peptidi, ki prehajajo skozi celico	10
4.2.7	Nanodelci zlata	11
5	OMEJITVE	11
5.1	IMUNOST	11
5.2	NETARČNO REZANJE ALI VEZAVA NA DNA	11

6	REŠITVE	12
6.1	DVOJNI ENOJNI REZ	12
6.2	FOKI POVEZAVA	12
6.3	IZBOLJŠAVE VODEČE RNA	13
6.4	IZBOLJŠAVE PROTEINA Cas9	13
6.5	NAPOVED POTENCIALNIH NETARČNIH MUTACIJ	13
6.6	DETEKCIJA NETARČNIH MUTACIJ	14
6.7	ČAS IZPOSTAVITVE SISTEMU	15
6.7.1	Vnos AAV, kjer se Cas9 sam izbriše	15
6.7.2	Kemično inducibilen CRISPR/Cas9	16
6.7.3	S svetlobo inducibilen sistem CRISPR/Cas9	16
7	ZAKLJUČEK	16
8	VIRI	17

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primerjava različnih sistemov, ki uporabljajo efektorske domene, vezane na dCas9.	3
Preglednica 2: Primerjava različnih mehanizmov za vnos sistema CRISPR/Cas9.....	8
Preglednica 3: Primerjava izboljšanih proteinov Cas9.	13
Preglednica 4: Primerjava različnih prosto dostopnih bioinformatičnih orodij za napoved netarčnih mest.	14
Preglednica 5: Primerjava različnih metod za detektiranje netarčnih mutacij.	14
Preglednica 6: Primerjava učinkovitosti različnih metod za detekcijo netarčnih mest (Kim in sod., 2018).	15

KAZALO SLIK

Slika 1: Način delovanja sistema CRISPR/Cas9, vodenega z dupleksom crRNA:tracrRNA (Doudna Charpentier, 2014).	1
Slika 2: Kompleks sgRNA:DNA:PAM (Anders in sod., 2014).	2
Slika 3: Sistem dCas9-SAM (Zhang in sod., 2015).	4
Slika 4: Primerjava sistemov dCas9-VP64 in dCas9-SunTag-VP64 (Tanenbaum in sod., 2014).	4
Slika 5: Način delovanja sistema TET in DNMT (Liu in sod., 2016).	6
Slika 6: Sistem dveh delno nukleazno aktivnih Cas9 proteinov (Ran in sod., 2013).	12
Slika 7: FokI nukleaza, vodena z dCas9 (Tsai in sod., 2014).	12
Slika 8: Uporaba sistema AAV, kjer se Cas9 sam izbriše (Li in sod., 2019).	15
Slika 9: Mehanizem delovanja s svetlobo inducibilnega sistema CRISPR/Cas9 (Nihongaki in sod., 2015).	16

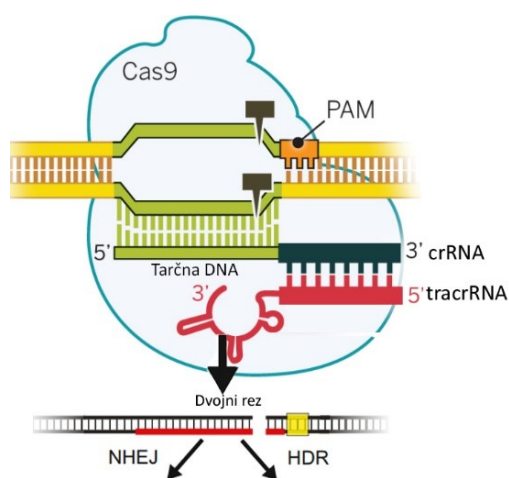
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
CRISPR	Gruče enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev (angl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
Cas9	S CRISPR povezan protein (angl. CRISPR associated protein)
NHEJ	Nehomologno združevanje koncev (angl. non-homologous end joining)
HDR	Popravilo, vodeno s homologijo (angl. homology driven repair)
dCas9	deaktiviran Cas9 (angl. deactivated Cas9)
tracrRNA	Trans-aktivirajoča crisper RNA (angl. trans activating CRISPR RNA)
crRNA	CRISPR RNA
sgRNA	Enojna vodeča RNA(angl. single guide RNA)
PAM	Motiv, ki je nasproti prvotnega vmesnika (angl. protospacer adjacent motif)
domena PI	Domena, ki je v interakciji z PAM (angl. pam interacting domain)
Zanka R	Troveržna struktura (razklenjena tarčna DNA in sgRNA, ki je vezana na komplementarni del DNA)
tDNA	Tarčna DNA
TALE(n)	Nukleaza, podobna transkripcijskemu aktivatorju (angl. transcription activator like effector (nuclease))
VPR	Efektor, ki združuje atranskripcijske faktorje VP64, p65 in Rta
SAM	Posrednik sinergistične aktivacije (angl. synergistic activation mediators)
AAV	Virus, povezan z adenovirusom (angl. adenovirus-associated virus)
KRAB	Škatla, povezana z genom Krüppel (angl. Krüppel associated box)
RNAi	RNA interference
Dnm3a	DNA metil transferaza
Tet 1	Hidroksilaza ten eleven 1
BE3	Bazni urejevalec tretje generacije
HIV	Virus humane imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)
mRNA	sporočevalna RNA (angl. messenger RNA)
RNP	Ribonukleopeptid (angl. ribonucleopeptide)
ZAL	Amino lipidni ion dvojček (angl. zwitterionic amino lipid)
PEI	Polieten amin
CD8+ T	Citotoksična celica T
MHC	Poglavitni kompleks tkivne skladnosti (angl. major histocompatibility complex)
ZFN	Nukleaza z motivom cinkovega prsta (angl. zinc finger nuclease)
HTGTS	Visoko prepustno sekvenciranje translokacij po celotnem genomu (angl. high throughput, genome wide translocation sequencing)
NGS	Sekveniranje naslednje generacije (angl. next generation sequencing)

1 UVOD

Sistem CRISPR/Cas9 (angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR) je bil sprva odkrit v bakterijah, kjer ima vlogo obrambnega mehanizma pred vdorom nekaterih virusov. Protein Cas9 je bil najprej izoliran iz bakterije *Streptococcus pyogenes*. Ima dve nukleazni domeni, HNH (Haft in sod., 2005) in RuvC (Makarova in sod., 2006), ki sta odgovorni za rezanje DNA plazmidov in bakteriofagov, ki napadajo celico (Sapranauškas in sod., 2011). Obstaja več Cas9 proteinov, ki izhajajo iz različnih organizmov. Tekom diplomske naloge se bom osredotočil na najbolj uporabljen spCas9, izoliran iz *Streptococcus pyogenes*, ki bo poimenovan s Cas9.

Zaradi specifičnosti proteina Cas9, da prepozna točno določenega tarčnega zaporedja, je bil kmalu prepoznan biotehnološki potencial sistema. Najprej je bil razvit klasičen sistem CRISPR/Cas9, ki prepozna tarčno zaporedje in reže DNA, nato pa sledi popravilo preko dveh mehanizmov. Z nehomologo popravo koncev DNA (angl. non-homologous end joining – NHEJ) celica popravi prelom verige, a vnese različne mutacije (delecije, insercije), ki običajno vodijo do izbitja gena (angl. knockout). Drug način pa je popravilo, vodeno s homologijo (angl. homology driven repair – HDR). Skupaj s sistemom je v celico vnesena tudi matrična DNA, ki se preko homolognih rok s pomočjo popravljalnega mehanizma vgradi v genom.



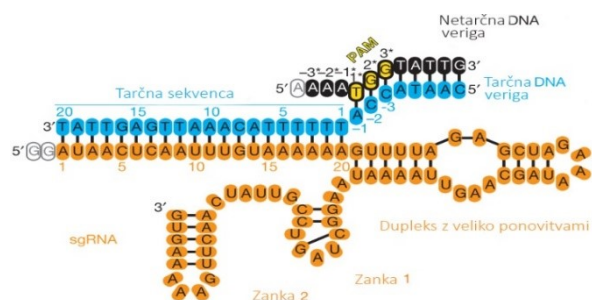
Slika 1: Način delovanja sistema CRISPR/Cas9, vodenega z dupleksom crRNA:tracrRNA (Doudna Charpentier, 2014).

V nalogi se bom osredotočil predvsem na novejšje aplikacije sistema CRISPR/Cas9, ki se bolj kot na klasične metode direktnega spreminjanja genoma osredotočajo na indirektno spreminjanje. Deaktiviran protein (angl. deactivated Cas9 – dCas9) se poveže z dodatno, efektorsko domeno. Efektor lahko povzroči aktivacijo ali utišanje ciljnega gena, poleg tega pa lahko služi za tarčno epigenetsko spreminjanje regulatornih regij ali kot posrednik pri vizualizaciji posameznih genov. Poleg tega bom pisal tudi o problemih, s katerimi se sistem CRISPR/Cas9 trenutno sooča ter o novih rešitvah, s katerimi bi se lahko ti problemi premostili.

2 MEHANIZMI DELOVANJA

2.1 KOMPLEKS tracrRNA:crRNA

Trans aktivirajoča CRISPR RNA (tracrRNA) je ključnega pomena za aktivacijo crRNA, njeno uspešno rezanje z ribonukleazo III in povezavo s Cas9 proteinom. Ko se ta kaskada zgodi, pride v celici do sekvenčno tarčne imunosti proti parazitom (Deltcheva in sod., 2011). Proteinski kompleks CRISPR/Cas9 je DNA nukleaza, ki s pomočjo povezave tracrRNA:crRNA tarčno reže DNA, (Jinek in sod., 2012). HNH domena na Cas9 proteinu je odgovorna za cepitev vezi na DNA verigi, ki je komplementarna 20 nukleotidov dolgem zaporedju crRNA, medtem ko RuvC naredi rez na nasprotni verigi (Gasiunas in sod., 2012). Z uporabo točkovne mutacije na domeni HNH ali RuvC dobimo protein, ki reže le na eni verigi, če pa pride do inaktivacije obeh domen, pa dobimo protein, ki se lahko tarčno veže na določene odseke na DNA. Istočasno je bila sintetično izdelana vodeča molekula sgRNA (angl. single guide RNA), ki združuje uporabni lastnosti tracrRNA in crRNA. Na 5' koncu ima 18-21 baz dolgo zaporedje, ki se tarčno veže na DNA, na 3' koncu pa ima strukturo v obliki enoverižnega dupleksa, s katero se veže na Cas9 protein (Jinek in sod., 2012). S tehnologijo uporabe sgRNA se lahko tako sistem CRISPR/Cas9 programira, da tarčno reže na skoraj kateremkoli mestu v genomu.



Slika 2:Kompleks sgRNA:DNA:PAM (Anders in sod., 2014).

2.2 PAM IN VEZAVA NA DNA

Ugotovljeno je bilo, da kompleks Cas9:tracrRNA:crRNA po rezanju DNA naredi tope konce, tri do osem baznih parov navzdol od zaporedja treh baznih parov, ki so bile poimenovane motiv PAM (angl. protospacer adjacent motif) (Jinek in sod., 2012). Značilnost tega zaporedja je, da je vedno enako in je odvisno od tipa proteina Cas9, ne pa od zaporedja tracrRNA ali crRNA. Leta 2014 so določili kristalno strukturo Cas9 v kompleksu s sgRNA in delno s tarčno DNA. V kompleksu je prva baza, ki se loči od sestrške verige, prav prva baza, ki je komplementarna komplementarnem zaporedju na sgRNA, medtem ko ostanejo baze v zaporedju PAM navzgor od tarčne DNA povezane skupaj. Gvanina v 5'-TGG-3' zaporedju tvorita vodikovi vezi z argininskima ostanoma (Arg 1333 in Arg 1335), nukleotidi na komplementarni verigi pa niso prepoznani z nobeno domeno. Menjave aminokislinskih ostankov na mestih, ki prepoznavajo PAM, privedejo do bistveno zmanjšane zmožnosti za vezavo na DNA (Anders in sod., 2014).

2.3 CEPITEV DNA VERIGE

Z namenom ugotoviti mehanizem tvorjenja kompleksa, je bila določena kristalna struktura kompleksa sgRNA:Cas9 v interakciji s tarčno DNA. Domena PI (angl. PAM interacting) prepozna zaporedje PAM na nekomplementarni verigi in povzroči formacijo t.i. zanke R. Po vzpostavitvi te zanke se spremeni konformacija na domeni HNH, ki se približa in reže komplementarno verigo v dupleksu sgRNA:tDNA, medtem ko domena RuvC reže nekomplementarno verigo (Nishimasu in sod., 2014).

3 APLIKACIJE

3.1 UPORABA DEAKTIVIRANEGA CAS9 PROTEINA

Vsi opisani sistemi temeljijo na katalitsko deaktiviranemu proteinu Cas9– dCas9 (z mutacijama D10A in H840A). dCas9 se v kompleksu s sgRNA veže na tarčno mesto in služi kot osnova za vezavo različnih funkcionalnih domen, vendar nima nukleazne sposobnosti (Jinek in sod., 2012). V tabeli so predstavljene različne domene in njihove funkcije (Tabela 1). Nekaj sistemov izvira iz idej, ki so bile v preteklosti že preizkušene na osnovi TALEN (angl. transcription activator like effector nuclease), nekaj aplikacij pa je bilo prvič testiranih na sistemu z dCas9.

Preglednica 1: Primerjava različnih sistemov, ki uporabljajo efektorske domene, vezane na dCas9.

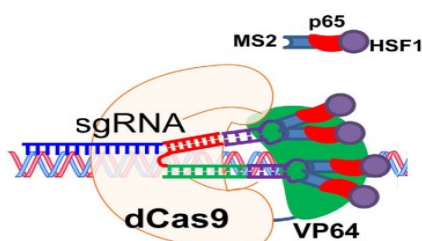
Funkcija	Domena, vezana na dCas9	Vir
Aktivacija transkripcije	VP64, VPR (VP64-p65-Rta), SAM, SunTag	(Maeder in sod., 2013), (Chavez in sod., 2015), (Koneremann in sod., 2015), (Tanenbaum in sod., 2014)
Utišanje transkripcije	Škatla, povezana s Krüppel-om (KRAB), Sterična prekinitev prepisovanja	(Gilbert in sod., 2013), (Moreno in sod., 2018), (Qi in sod., 2013)
Urejanje posamezne baze	Citidin deaminaza, adenzin deaminaza	(Komor in sod., 2016), (Gaudelli in sod., 2017)
Acetilacija (aktivacija)	Acetil transferaza	(Hilton in sod., 2015)
Metilacija (utišanje)	Metil transferaza (Dnmt3a)	(Vojta in sod., 2016), (Liu in sod., 2016)
Demetilacija	Ten eleven 1 hidroksilaza	(Xu in sod., 2016), (Morita in sod., 2016)

3.1.1 Aktivacija genov

Leta 2013 je bilo potrjeno, da so heterologne efektorske domene lahko spojene z dCas9 proteinom brez opazne slabše učinkovitosti pri tarčni vezavi na DNA (Maeder in sod., 2013). Z dCas9 je bil spojen aktivacijski protein VP64. Prve raziskave niso pokazale aktivacije večjih magnitud, rezultati pa so bili boljši pri uporabi več tarčnih sgRNA za aktivacijo enega gena.

SAM

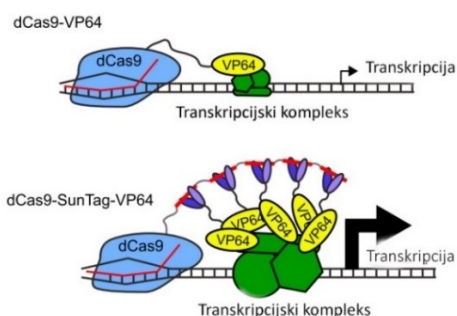
Pri tehnologiji SAM (sinergijski posrednik aktivacije) je bil preko kristalne strukture Cas9:sgRNA, vezane na tarčno DNA, opažen del sgRNA, ki ni v stiku s Cas9 in ne vpliva na katalitično funkcijo Cas9 proteina. Na to mesto je bila dodana aktivacijska domena, s pomočjo posebej načrtovane lasne zanke RNA, ki je aptamer (lahko tarčno veže MS2 plaščni protein iz bakteriofaga), na katero je vezan aktivator VP64. Povečano izražanje genov bilo najučinkovitejše pri hibridnem proteinu dCas9:VP64 s konstruirano podenoto MS2-p65-HSF1. Prednosti te tehnologijesta robustnost in specifičnost . Lahko se uporabi samo ena sgRNA na tarčo, kar omogoči učinkovito sočasno povečanje izražanja več genov, prav tako pa za sistem ni opaznih večjih netarčnih učinkov. Problem predstavlja velikost zaporedja za dCas9, sgRNA in vse ko-transkripcijske elemente, saj ti presegajo največje velikosti za dostavo vektorjev z virusom, povezanim z adenovirusom (angl. Adenovirus-associated virus - AAV) (Konermann in sod., 2015). Mogoča je dodatna optimizacija sgRNA s spreminjanjem deleža nukleotidov G in C ali s krajšanjem nekaterih ponovljivih zaporedij do te mere, da postane mogoča dostava z AAV, ki je najbolj uporabljena metoda vnosa vektorjev (Campistol in sod., 2017).



Slika 3: Sistem dCas9-SAM (Zhang in sod., 2015).

SunTag (SUpErNova tag)

Sistem je bil sprva uporabljen za vizualizacijo s fluorescenčnimi proteini. Tehnologija SunTag temelji na peptidih, ki lahko nase vežejo do 24 proteinov. Na dCas9 so preko peptidov vezani transkripcijski faktorji VP64. Tak kompleks poveča ekspresijo genov, hkrati pa je zelo robusten. Nova tehnologija je odprla nove možnosti, saj se s sistemom SunTag lahko poveča ekspresija tudi z uporabo le ene tarčne sgRNA. Torej bi se lahko začelo tudi s sistemom CRISPR aktivacije uporabljati več sgRNA za sočasno spreminjanje aktivnosti več tarč (Tanenbaum in sod., 2014).



Slika 4: Primerjava sistemov dCas9-VP64 in dCas9-SunTag-VP64 (Tanenbaum in sod., 2014).

VPR

VPR je transkripcijska domena, ki je dobila ime po začetnicah treh delov, iz katerih je sestavljena. To so transkripcijske domene VP64, p65 in Rta. Z namenom učinkovitejše aktivacije genov so najprej razvili hibridni aktivator, in sicer s sklopitvijo posameznih domen v ustrezno zaporedje (dCas9-VP64-Rta), ki poveča izražanje genov v primerjavi z Cas9-VP64 hibridom. Opazili so tudi, da obstaja obratna korelacija med normalno ekspresijo gena in relativnim povečanjem ekspresije z dCas9 aktivatorjem, kjer se genom z močno ekspresijo le ta poveča relativno malo, obratno pa velja za gene s šibko ekspresijo, pri katerih je bila ugotovljena relativno velika sprememba (Chavez in sod., 2015).

3.1.2 Utišanje genov

Inaktivacija s sterično prekinitvijo prepisovanja gena

Neaktivna oblika Cas9 proteina je uporabljena kot ovira za DNA polimerazo pri prepisovanju. Qi in sodelavci (2013) so potrdili, da je taka inaktivacija genov reverzibilna in visoko specifična, prav tako pa se lahko hkrati uporabi več sgRNA za regulacijo več genov hkrati. Vse to so potrdili tudi na človeških celicah, vendar učinkovitost take inaktivacije ni dovolj visoka in je bila v novejših raziskavah izboljšana.

Inaktivacija z uporabo represorske domene KRAB

Za to aplikacijo se uporabi dCas9, ki je sklopljen z inaktivacijsko domeno – škatla povezana z genom Krüppel - KRAB (angl. Krüppel associated box). Deluje po enakem principu kot aktivator, le da utiša prepisovanje gena, tarča za sgRNA pa se nahaja na promotorju pred genom (Gilbert in sod., 2013). Aplikacija ima potencial tudi pri souporabi s tehnologijo RNA interference (RNAi), saj imata metodi enak cilj, ampak različen in komplementaren pristop. Najnovejše raziskave so ta način deaktivacije genov še izboljšale in dokazale uporabnost sistema pri aplikacijah »in vivo« (Moreno in sod., 2018).

3.1.3 Epigenetsko remodeliranje

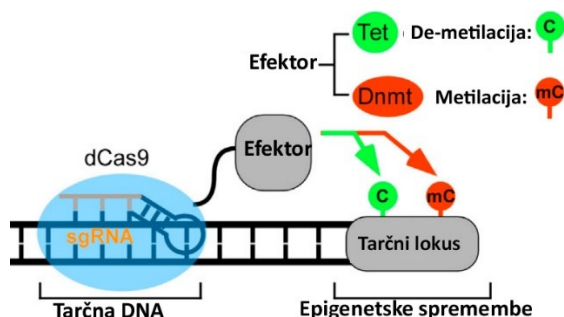
Acetilacija

Za ta način uporabe je dCas9 s C-terminalno stranjo spojen z acetil transferazo p300, ki katalizira acetilacijo histona H3 (lizin 27) in tako poveča prepisovanje genov v okoliških regijah. Dokazano je bilo, da sta acetilacija in tarčno povečanje izražanja genov povezana. Na ta način so bili z visoko specifičnostjo aktivirani geni iz oddaljenih in bližnjih regulatornih regij. (Hilton in sod., 2015).

Metilacija

Z metilacijo pomotorskih regij, k vsebujejo otoke CpG, se lahko z uporabo dCas9, povezanega z določenimi encimi, doseže tarčno utišanje genov, reguliranih z omenjenim tarčnim promotorjem. Že pred prvimi raziskavami na sistemu CRISPR/Cas9 je bil encim metil transferaza Dnmt3a preizkušen s sistemom TALEN. Sistem dCas9 je približno dvakrat bolj

učinkovit tako pri aktivaciji genov zaradi demetilacije, kot pri utišanju genov z metilacijo. Rezultati študije, ki so jo izvedli Liu in sodelavci (2016), kažejo na zelo specifično metilacijo tarčnih mest in učinkovito utišanje tarčnih genov.



Slika 5: Način delovanja sistema TET in DNMT (Liu in sod., 2016).

Združen protein dCas9-DnmT3a specifično metilira regijo približno 35 baznih parov, ki se nahaja 27 baznih parov navzdol od zaporedja PAM. Prikazana je bila učinkovita metilacija otokov CpG. Z uporabo več sgRNA pa se lahko metilira večji del promotorja, kar še dodatno pripomore k učinkovitosti sistema (Vojta in sod., 2016).

Možna je tudi povezava več sistemov. Sistem, ki sočasno uporablja efektorje KRAB, DnmT3a in DnmT3l, je zelo učinkovit, hkrati pa vsi trije proteini, ki so vpleteni v utišanje prepisovanja, delujejo sinergistično. Po takšni inaktivaciji ni bila mogoča ponovna aktivacija z klasičnimi načini, ki temeljijo na efektorjih VP64 ali p300. Izražanje je zopet vzpostavila šele inhibicija metilacijskih - DnmT domen, oziroma inaktivacija z uporabo DNA demetilaze TET1. Omejitev tega sistema je predvsem v mestih CpG, ki so pogojeni z zaporedjem promotorja, vendar je možna tudi metilacija ključnih mest CpG v promotorskih regijah z malo otoki CpG (Amabile et al., 2016).

Demetilacija

Za demetilacijo že metiliranih regij CpG v genomu in posledičen začetek prepisovanja utišanih genov je uporaben encim hidrosilaza »ten eleven« (TET) 1, ki sproži demetilacijo. Tako kot pri sistemu za metilacijo, je tudi pri demetilaciji možnih več pristopov, ki se med sabo razlikujejo po načinu vezave efektorskega proteina.

Na plaščni peptid bakteriofaga MS2 povezan na aptamer lasne zanke sgRNA, so vezali encim TET1. Tarčne regije v genomu so bile specifično in učinkovito demetilirane, kar je sprožilo prepisovanje ciljnih genov (Xu in sod., 2016). Proteine TET1 je mogoče uporabiti tudi s sistemom SunTag. Opaženo je bilo več kot 90 % demetilacije, tudi na mestih CpG, ki so od tarčnih oddaljeni 100 baznih parov (Morita in sod., 2016).

3.1.4 Urejanje posameznih baz

Urejanje posameznih baz je lahko pomembno orodje pri usmerjeni mutagenizi tarčnih delov DNA. Zmožnost generiranja visokega števila poznanih mutacij lahko ustvari velike knjižnice

mutiranih proteinov, kar omogoči uporabo sistemov za visoko prepustno iskanje (angl. high throughput screening) različnih vzorcev, ki so povezani z mutacijo. Tak pristop je uporaben pri napovedovanju odpornosti na antibiotike ali identifikacijo antibiotikov, ki imajo manj možnosti za razvoj odpornosti (Nyerges in sod., 2018), vodeno evolucijo proteinov tudi v sesalčjih celicah, ki je bila do sedaj možna samo v bakterijskih ali kvasnih celicah ali pri identifikaciji lastnosti proteinov, kot so povezave genotipa in fenotipa, vpliv točkovnih mutacij, itd. (Ma in sod., 2016).

Citidin deaminaza

To je sistem, ki temelji na povezavi encima citidin deaminaze s sistemom CRISPR/Cas9. Encim je vezan na Cas9, podobno kot pri že opisanih sistemih za aktivacijo prepisovanje genov. Citidin deaminaza katalizira pretvorbo citidina v uridin, 4 do 8 mest navzdol od mesta PAM, na netarčni verigi. To povzroči substitucijo citozina v timin (in na komplementarni verigi gvanina v adenozin). Novejše generacije tega sistema so učinkovitost tarčne zamenjave še izboljšale. Uracil DNA glikozilaza je encim, ki katalizira popravilo U:G heterodupleksov, tako da jih večinoma popravi nazaj v C:G. Z inhibitorjem tega encima, vezanim na sistem, se učinkovitost še poveča. Prav tako se je povečala učinkovitost, ko so ponovno vzpostavili katalitsko aktivnost v domeni HNH proteina dCas9, tako da je lahko rezal le na verigi, ki ni bila spremenjena (Komor in sod., 2016). Naslednja inovacija pri sistemu je bila uporaba proteina Gam iz bakteriofaga Mu. Protein se veže na konce dvojnih prelomov vijačnice in jih ščiti pred degradacijo. Protein Gam je tako zmanjšal tvorbo insercij ali delecij tekom procesa urejanja posamičnih baznih parov. Tak sistem se imenuje BE3 (angl. base editor 3) (Komor in sod., 2017). BE3, povezan z delom proteina CDA1 ali PAPAPAP, ima še bolj specifično območje delovanja. Prvi naredi zamenjavo nukleotida na mestu -18, drugi pa med mestoma -14 in -16. Ta inovacija še poveča možnosti pri razvoju novih aplikacij (Tan in sod., 2019). Še vedno pa obstajajo težave z nespecifičnimi mutacijami, do katerih prihaja zaradi netarčnega delovanja sistema (Zuo in sod., 2019).

Adenozin deaminaza

Sistem deluje po enakem principu, kot že opisan sistem s citidin deaminazo, le da bazni par A:T spremeni v C:G. Razvit je bil preko več korakov vodene evolucije encima, zato obstaja več verzij encima, ki so uporabni za spreminjanje adenozina na različnih pozicijah, glede na zaporedje PAM (Gaudelli in sod., 2017). Ta sistem se ne srečuje s problemi nespecifičnih mutacij (Jin in sod., 2019).

CRISPR-STOP

Je tehnologija, pri kateri se s pomočjo urejanja posameznih baz v tarčni ekson doda predčasni stop kodon. Zaradi tega se transkripcija predčasno ustavi, produkt pa je nedelujoč protein. Z uporabo te tehnologije namesto klasičnega izbitja preko popravljalnega mehanizma NHEJ, se zmanjša možnost netarčnega delovanja sistema. Mehanizem ima težave predvsem pri popravljanju mest z več kopijami, nastanejo pa lahko usodne delecije ali insercije na nespecifičnih mestih, na tarčnem mestu pa lahko zaradi naključnega popravila nastane tudi delujoč protein z drugačnimi lastnostmi. Zaradi omejitve z mestom PAM ima sistem manjše

število potencialnih tarčnih mest za vnos stop kodonov. Novi proteini Cas9 s spremenjeno specifičnostjo do mest PAM bi lahko povečali uporabnost sistema (Kuscu in sod., 2017).

4 DOSTAVA

Preglednica 2: Primerjava različnih mehanizmov za vnos sistema CRISPR/Cas9

Način dostave	Oblika materiala	Vnos	Prednosti	Slabosti	Način uporabe
Mikroinjiciranje	DNA, mRNA za Cas9 in sgRNA, protein Cas9 sklopljen s sgRNA (RNP kompleks)	Direktno v jedro, citoplazma	Visoka uspešnost, brez velikostne omejitve vektorja, fleksibilna	<i>In vivo</i> uporaba ni mogoča, metoda tehnično zahtevna	<i>Ex vivo, in vitro</i>
Elektroporacija	DNA, mRNA za Cas9 in sgRNA, RNP kompleks	Citoplazma	Za tipe celic, ki se težko transformirajo		<i>Ex vivo, in vitro</i>
Hidrodinamski vnos	DNA, mRNA za Cas9 in sgRNA, RNP kompleks	Krvni obtok	Enostavnost	Mogoča samo uporaba <i>in vivo</i> , slaba učinkovitost, le določeni tipi celic	<i>In vivo</i>
Virus, povezan z adenovirusom (AAV)	sgRNA in Cas9 na adenovirusnem vektorju; sgRNA z AAV (Cas9 že izražen); Cas9 na dveh adenovirusnih vektorjih		Širok spekter uporabe, visoka uspešnost	Imunogenost, integracije, konstitutivno izražanje	<i>In vivo, in vitro, ex vivo</i>
Lentivirus	AAV	Integracija v genom	Velikost vključka	Imunogenost	<i>In vivo, in vitro, ex vivo</i>
Adenovirus	AAV	Adenovirusni vektor	Velikost vključka	Imunogenost, nespecifična integracija	<i>In vivo, in vitro, ex vivo</i>
Liposom	DNA, mRNA za Cas9 in sgRNA, RNP kompleks	Medceličnina	Ne povzroči imunskega odziva zaradi epitopov, tarčna dostava	Slaba učinkovitost, citotoksičnost	<i>In vivo, in vitro, ex vivo</i>
Lipopleks	DNA, mRNA za Cas9 in sgRNA, RNP kompleks	Medceličnina			<i>In vivo, in vitro, ex vivo</i>
Peptid, ki prehaja skozi celico	Cas9, sklopljen na sgRNA, kovalentno vezan na peptid	Medceličnina		Ni mogoča <i>in vivo</i> aplikacija, zahtevnost metode	<i>Ex vivo, in vitro</i>
Nanodelec zlata	Material je vezan na nanodelec	Endocitoza, v citoplazmo	Ni citotoksičnosti, višja učinkovitost za HDR		<i>In vivo, ex vivo, in vitro</i>

4.1 VIRUSNI VEKTORJI

Tehnika vnosa genskega materiala v celice z vektorji z adenovirusi povezanih virusov (AAV) je uporabna zaradi več razlogov. Virus pri človeku ne povzroča nobene bolezni, celice pa okuži z zelo veliko učinkovitostjo. Virus sam po sebi povzroči zelo majhen oziroma praktično ničen imunski odziv ((Daya Berns, 2008). Vseeno pa so bili imunski odzivi opaženi zaradi virusnega ovoja, ki lahko v skrajnih primerih povzroči celo CD-8 T-celični imunski odziv (Samulski Muzyczka, 2014). Kljub vsemu pa to ne predstavlja tako velikega problema, saj obstaja veliko serotipov virusa z različnimi tropizmi, zato se je takšnim težavam mogoče že vnaprej izogniti.

Na ta način vnesen dedni material se izraža konstitutivno in je lahko v celici v obliki eksogene DNA ali pa se z nekaj modifikacijami vgradi v genom. Uporabljajo se trije načini dostave elementov sistema CRISPR/Cas9 v organizem: a) Zapisa za protein Cas9 in sgRNA se nahajata na enem plazmidnem vektorju in se vneseta v celico z delcem AAV; b) Dostava sgRNA z AAV v celice, ki že izražajo Cas9 (Platt in sod., 2014); c) Dostava Cas9 in sgRNA z ločenima adenovirusnima vektorjema, s katerima se istočasno okuži tarčni organizem (Truong in sod., 2015).

Poleg AAV pa je dostava mogoča tudi uporabo lentivirusnega ali adenovirusnega vektroja. Oba vektorja sta konstruirana na podoben način. Ogrodje lentivirusnega predstavlja provirus HIV, ogrodje adenovirusnega vektorja pa serotip adenovirusa.

4.2 METODE NEVIRUSNEGA VNOSA VEKTORJA

4.2.1 Mikroinjiciranje

Mikroinjiciranje je najbolj razširjena oblika vnosa komponent CRISPR/Cas9 v celice (Hori, 2013). S to metodo se material, s pomočjo mikroskopa in igle s premerom 0,5 – 5 um, vnese direktno v notranjost celice. Količina vnesenega materiala je poznana, kar ima pomemben vpliv pri nadzoru netarčnih učinkov. Težava pri tej metodi je, da je enoverižna DNA podvržena k naključni integraciji v genom (kar lahko prekine gene) in posledičnem konstitutivnem izražanju Cas9, kar lahko povzroči neželene netarčne mutacije.

Druga možnost je vnos mRNA v celico. Idealen bi bil vnos sgRNA direktno v jedro in hkraten vnos mRNA za Cas9 v citoplazmo, da se tam prepiše in transportira v jedro, vendar je zaradi zahtevnosti procesa tak način vnosa nepraktičen (Yang in sod., 2013). sgRNA in mRNA se običajno vneseta direktno v citoplazmo, kjer se mRNA prepiše v Cas9, ki se še v citoplazmi sklopi z sgRNA in se tako transportira v jedro. Večina raziskav, kjer so za vnos materiala uporabili metodo mikroinjiciranja, je uporabila tak material.

4.2.2 Elektroporacija

Elektroporacija je dobro znana metoda vnosa različnih materialov v celice. V celični membrani se pod visoko napetostjo za zelo kratek čas ustvarijo nanometerske pore, kar omogoči snovem premera do 0,1 nm prehod v celico. Zaradi visokih napetosti ta metoda ni uporabna za aplikacije *in vivo*.

4.2.3 Hidrodinamski vnos

Hidrodinamski vnos je tehnika za vnos genskega materiala *in vivo*. 8 – 10 % telesne mase raztopine z zelenim tovorom (plazmid, RNP kompleks) se vbrizga direktno v krvni obrok živali. Pri glodalcih (miših) je to običajno repna vena. V telesu pride do presežka tekočine in tako naraste hidrodinamski tlak, kar poveča prehodnost v endoteljske in parenhimske celice. Tako pride do vnosa DNA in proteinov (plazmid ali kompleks RNP) v najbolj prekrvavljene telesne organe.

4.2.4 Liposomi

Liposomi so običajno negativno nabiti (kationski) in so sestavljeni iz različnih vrst lipidnih nanodelcev. Izkoriščen je negativni naboj DNA ali RNA, ki se enkapsulira v sam liposom, ki nato skozi membrano preko endocitoze preide v notranjost celice. Vse te prepreke močno znižajo učinkovitost spreminjanja genoma. Eden glavnih problemov je v hkratnem vnosu proteina, sgRNA in DNA zaporedja za popravljen gen. Na točki, ko kompleks preide membrano, velikokrat pride do celičnega odziva, ki tujek prepozna in ga v lizosomu razgradi. Zelo uporabljen reagent Lipofectamine je po nekaterih navedbah citotoksičen, zato je pomemben razvoj novih nanodelcev, ki bi bili bolj varni (Wang in sod., 2016).

4.2.5 Lipopleksi

Lipopleksi so vrsta nanodelcev, ki delujejo po načelu elektrostatičnih interakcij. Pogosto je uporabljen komercialni reagent FuGENE 6 (Kennedy in sod., 2014). Lahko se uporabi tudi posebne nanodelce – amino lipidne ione dvojčke (angl. zwitterionic amino lipids – ZALs) ali polieten amin (PEI) in poli(L-lizin).

4.2.6 Peptidi, ki prehajajo skozi celico

Peptidi, ki so sestavljeni iz kratkih kationskih ali nepolarnih delov aminokislin, so sposobni prehajanja preko membrane. Protein Cas9 je običajno kovalentno vezan na tak peptid, kasneje pa je nanj vezana še sgRNA. Obstaja mnogo verzij takih peptidov, vsak z različnimi lastnostmi za transfekcijo različnih tipov celic. Za vsak tip vektorja in vsak tip celice, ki je tarča za modifikacije, je potrebno peptide zelo optimizirati (Ramakrishna in sod., 2014)

4.2.7 Nanodelci zlata

Način vnosa, ki se imenuje CRISPR-Gold, temelji na nanodelcih zlata, ki imajo premer 15 nm. Na njih so povezani tiol-oligonukleotidi, ki so hibridizirani z enoverižnimi donorskimi oligonukleotidi, ki so povezani s kompleksom Cas9 – RNP. Cel agregat je obdan s polimerom PAsp(DET), ki inducira endocitozo. Tak način dostave se je izkazal za zelo učinkovitega, predvsem za induciranje HDR. Prav tako pa sistem ni kazal citotoksičnosti (Lee in sod., 2017).

5 OMEJITVE

5.1 IMUNOST

Raziskave so pokazale, da so v človeškem telesu prisotne spominske celice T proti Cas9, katere bi se lahko hitro namnožile, ko bi bil Cas9 prepoznan s strani poglobitvenega kompleksa tkivne skladnosti (angl. major histocompatibility complex - MHC). Celice T CD8+ so izločale interferon-gama, kar pomeni, da bi lahko imele možnost ubijanja celic, ki izražajo protein Cas9. Stalno izražanje proteina Cas9 po dostavi z npr. virusnim vektorjem bi lahko vodila do citotoksičnosti (Charlesworth in sod., 2019; Wagner in sod., 2018). Avtorja se strinjata, da je to največji problem pri aplikacijah z dolgo izpostavljenostjo proteinu Cas9 (virusna dostava), ko bi imel imunski sistem največ časa za prepoznavo antigena in imunski odziv. Te omejitve pa ne bi smele vplivati na možnosti aplikacij *ex vivo*, sploh če je dostava v obliki RNP, ki je relativno kratkoživ. Ob vnosu popravljenega tkiva nazaj v telo imunski sistem tako proteina ne bi več zaznal.

Vnos sistema CRISPR/Cas9 v celice s pomočjo virusnih vektorjev ali elektroporacije lahko povzroči vnetne reakcije (Wang in sod., 2015). Enako je bilo potrjeno pri vnosu sistema z AAV, ko je bilo opaženo, da se je aktiviral imunski odziv. Imunski odziv sta sprožila tako protein Cas9, kot tudi AAV). Glavni epitopi se nahajajo na delih, ki so pomembni za aktivnost sistema (vezava domen Rec1– Cas9:sgRNA, vezavna zanka PAM, matična zanka sgRNA) (Chew in sod., 2016).

Zaradi napredka v usmerjeni evoluciji in racionalnem načrtovanju encimov bo v prihodnosti mogoče izdelati različne verzije proteina Cas9, ki teh motivov ne vsebujejo, kljub temu pa ohranijo aktivnost. Možna je tudi uporaba imunskih zaviralcev, kot so kortikosteroidi, ki se že uporabljajo v kombinaciji z AAV. Na enak način bi se lahko uporabili tudi po dostavi sistema CRISPR/Cas9, vendar je ta pristop možen le za kratkotrajno ublažitev simptomov. Za uporabo imunskih zaviralcev bi bila idealna kratkotrajna ekspresija Cas9, ki bi bil dostavljen preko nevirusnega vektorja (Crudele in Chamberlain, 2018).

5.2 NETARČNO REZANJE ALI VEZAVA NA DNA

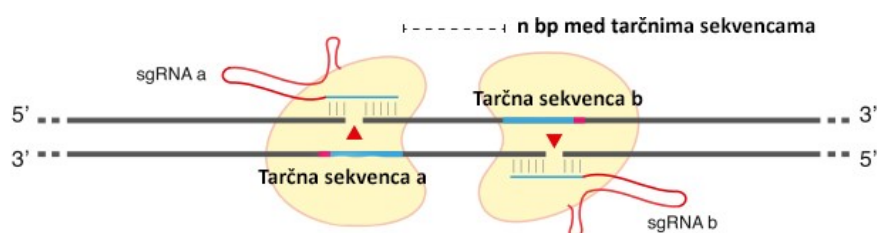
Kompleks Cas9:sgRNA za vezavo na DNA ne potrebuje 100 % homologije s tarčnim zaporedjem. V določenih primerih ohrani katalitično sposobnost tudi ko so v tem zaporedju

prisotni do trije bazni pari, ki niso skladni s sgRNA. Več raziskovalnih skupin je prišlo do zaključka, da sistem ne deluje dovolj specifično, zato je postalo preprečevanje netarčnih učinkov ena glavnih smeri raziskav, povezanih s sistemom (Tsai in Joung, 2016)

6 REŠITVE

6.1 DVOJNI ENOJNI REZ

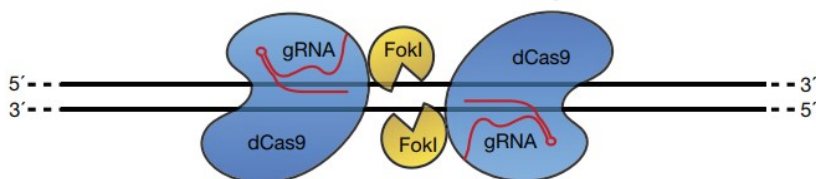
Dvojni enojni rez (angl. double nicking) je način uporabe sistema CRISPR/Cas9, ki poveča njegovo specifičnost. Gre za protein Cas9, ki zaradi mutacij v eni izmed domen RuvC (D10A) ali HNH (H840A) ohrani katalitično aktivnost samo za eno izmed verig (Jinek in sod., 2012). Tako sta za dvojni zlom vijačnice potrebna dva proteina, ki naredita rez vsak na svoji verigi. Za uspešen dvojni zlom vijačnice morata biti tarčna mesta med sabo oddaljena do 100 baznih parov, kar omogoča uporabo tega sistema na skoraj vseh mestih v genomu. Sistem dobro deluje za vnos mutacij (delecij – insercij), prav tako ima manj netarčnih učinkov kot uporaba navadnega proteina Cas9 (Ran in sod., 2013).



Slika 6: Sistem dveh delno nuklazno aktivnih Cas9 proteinov (Ran in sod., 2013).

6.2 FOKI POVEZAVA

Tehnologiji TALEN in ZFN - nukleaza z motivom cinkovega prsta (angl. zinc finger nuclease) za specifično rezanje DNA uporabljata nespecifično nukleazo FokI. Enak princip je bil uporabljen za povečanje specifičnosti sistema CRISPR/Cas9. Dva neaktivna proteina dCas9 sta s C- oz. N- terminalnim delom povezana z nukleazo FokI. Med tarčama za sgRNA je potreben vmesnik 14 – 17 baznih parov. Do reza pride šele, ko se na tarčo vežeta oba proteina dCas9 in se nukleazi FokI povežeta, kar v teoriji močno zmanjša število potencialnih mest za netarčne vezave. Sistem je manj učinkovit kot navaden sistem Cas9, vendar je veliko bolj specifičen (Guilinger in sod., 2014; Tsai in sod., 2014). Zaradi visoke specifičnosti bi bil sistem lahko uporaben za najbolj občutljive uporabe, kot je npr. terapevtsko spreminjanje človeškega genoma



Slika 7: FokI nukleaza, vodena z dCas9 (Tsai in sod., 2014).

6.3 IZBOLJŠAVE VODEČE RNA

Izboljšanje same sgRNA lahko vodi do višje specifičnosti sistema. Ker je tolerirano visoko število napačnih baznih parov (do 5), predvsem na 5' koncu, oddaljenem od zaporedja PAM, so raziskovalci skrajšali zaporedje sgRNA, ki je homologna tarčnemu mestu, iz 20 baznih parov na 17. Sprememba se je izkazala kot pozitivna z manj netarčnimi učinki in ohranitvijo učinkovitosti sistema (Fu in sod., 2014).

6.4 IZBOLJŠAVE PROTEINA CAS9

Že od odkritja sistema CRISPR/Cas9 je bila optimizacija proteina Cas9 ena glavnih možnosti za izboljšanje sistema. Spremembe v proteinu lahko vodijo v spremembe v načinu delovanja, povečanje specifičnosti delovanja, zmanjšanje netarčnih mutacij ali pa optimizacijo mesta PAM, ki omogoči še širše in bolj natančno delovanje sistema. V tabeli so opisane nekatere zanimive oblike spremenjenega proteina Cas9.

Preglednica 3: Primerjava izboljšanih proteinov Cas9.

Izboljšava proteina Cas9	Spremembe	Ugotovitve	Vir
Kot PAM prepoznavna zaporedje NGA	Tri aminokislinske mutacije (D1135V/R1335Q/T1337R)		(Kleinstiver in sod., 2015)
Kot PAM prepoznavna zaporedje NGC	Štiri aminokislinske mutacije (D1135V/G1218R/R1335E/T1337R)		
Manj netarčnih mutacij	Tri aminokislinske mutacije (K848A/K1003A/R1060A)	Netarčni rezi se zgodijo, ko je moč vezave Cas9 na netarčno DNA verigo večja od sile rehibridizacije	(Slaymaker in sod., 2015)
Kot PAM prepoznavna zaporedje NG, GAA ali GAT	Fagna evolucija, tri do sedem aminokislinskih mutacij	Protein xCas9 je učinkovitejši od Cas9, manj netarčnih mutacij	(Sun in sod., 2018)
Kot PAM prepoznavna zaporedje NG; (Prepoznavna NGD; D = A, C, T)	Racionalni razvoj – šest aminokislinskih mutacij (R1335V/L1111R/D1135V/G1218R/ E1219F/A1322R/T1337R)	Prikazana uporaba dCas9 s citidin deaminazo Bolj specifična prepoznavna od xCas9	(Nishimasu in sod., 2018)

6.5 NAPOVED POTENCIALNIH NETARČNIH MUTACIJ

Pomemben del minimizacije netarčnih mutacij je tudi predhodna karakterizacija tarčnih zaporedij in izbor najbolj primerne na podlagi predhodne ocene. Do zdaj je bilo razvitih več bioinformatičnih orodij, ki na različne načine opredelijo tarčno zaporedje in ocenijo možnosti neželenih učinkov (slaba učinkovitost ali netarčne mutacije).

Preglednica 4: Primerjava različnih prosto dostopnih bioinformatičnih orodij za napoved netarčnih mest.

Orodje	Način delovanja	Drugo	Vir
CCTop	Algoritem glede na eksperimentalne podatke opredeli možnost netarčne vezave, jih poveže z bližnjimi eksoni	Za točkovanje možnosti netarčne vezave upošteva, da se možnost netarčne vezave poveča, če pride do netarčne povezave med baznima paroma na delu tarčne DNA, oddaljenim od zaporedja PAM.	(Stemmer in sod., 2015)
CRISPRater	Nadgradnja CCTop, upošteva delež GC na delu sgRNA, blizu in daleč od PAM.	Visok delež GC na delu tarčne DNA, ki je blizu zaporedju PAM in nizek delež GC na od PAM-oddaljenem delu tarčne DNA pozitivno vplivata na učinkovitost sistema CRISPR/Cas9	(Labuhn in sod., 2018)
CNN_std	Uporaba globokega učenja in nevralne mreže za predvidevanje netarčnih učinkov. Uporablja podatkovne baze CRISPOR in GUIDE-seq		(Lin Wong, 2018)
Elevation	Podlaga je strojno učenje glede na eksperimentalne rezultate. Sodelovanje s podjetjem Microsoft		(Doench in sod., 2016; Listgarten in sod., 2018)

6.6 DETEKCIJA NETARČNIH MUTACIJ

Poleg napovedovanja možnih netarčnih mutacij pa je pomembna tudi povezava napovedi z eksperimentalnimi podatki. V tabeli so predstavljene nekatere metode, s katerimi je mogoče na različne načine odkriti netarčne mutacije.

Preglednica 5: Primerjava različnih metod za detektiranje netarčnih mutacij.

Detekcija netarčnih mutacij v celici		
GUIDE-seq	Označevanje dvojnih zlomov na DNA z integracijo dvoverižnih oligodeoksi nukleotidov.	(Tsai in sod., 2015)
BLISS	Označevanje dvojnih zlomov v fiksiranem tkivu, izolacija DNA in transkripcija <i>in vitro</i> . Po sekveniranju je razvidno kje je prišlo do rezanja.	(Yan in sod., 2017)
<i>In vitro</i> detekcija netarčnih mutacij		
Digenome-seq	Sekveniranje <i>in vitro</i> z nukleazo rezanih genomov. Pri poravnavi izstopajo fragmenti z identičnimi 5' konci, ki so bili rezani.	(Kim in sod., 2015)
CIRCLE-seq	DNA se cirkulira v plazmide, na katere deluje Cas9. Po dvojnem zlomu se sestavi nazaj. Po sekveniranju je razvidno, kje je prišlo do netarčnih mutacij.	(Tsai in sod., 2017)
SITE-seq	Rezana DNA je označena z biotinom in opremljena z začetnimi oligonukleotidi za NGS. Rezultati so poravnani z referenčnim genomom.	(Cameron in sod., 2017)
DIG-seq	Metoda Digenome-seq je uporabljena na DNA, ki je v stanju nativnega kromatina.	(Kim Kim, 2018)

Pri vzpostavljanju metode DIG-seq je bilo ugotovljeno, da je za netarčno vezavo sgRNA pomembna kromatinska sestava lokusa. Do veliko več mutacij pride, ko je tarča na kromatinsko

odprti DNA. Enako ne velja za sgRNA, ki se veže na tarčno zaporedje, saj incidenca vezave in reza v primeru tarčne vezave ni odvisna od kromatinske zgradbe DNA.

Netarčni učinki se pogosto karakterizirajo glede na delovanje sistema CRISPR/Cas9 na mesto VEGF-A. Rezultati primerjave med metodami DIG-seq, Digenome-seq, CIRCLE-seq in SITE-seq so predstavljeni v spodnji preglednici.

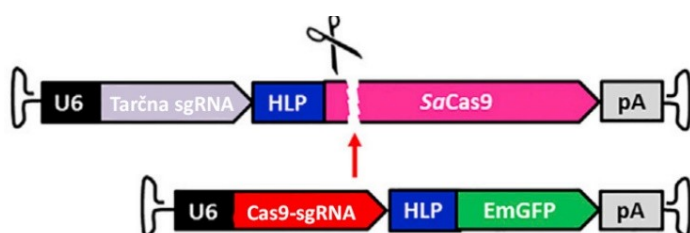
Preglednica 6: Primerjava učinkovitosti različnih metod za detekcijo netarčnih mest (Kim in sod., 2018).

Ime metode	Število <i>in vitro</i> detektiranih netarčnih mest na tarčnem mestu VEGF-A	Odstotek validiranih mutacij po sekveniranju nove generacije (%)
Digenome-seq	151	Ni podatka
CIRCLE-seq	497	29 %
SITE-seq	966	10 %
DIG-seq	31	62 %

6.7 ČAS IZPOSTAVITVE SISTEMU

6.7.1 Vnos AAV, kjer se Cas9 sam izbriše

Čas izpostavitve Cas9 proteinu je pomemben parameter pri kontroli netarčnih mutacij (Cameron in sod., 2017), zato je bila razvita metoda vnosa sistema, ki poleg tarčne spremembe genoma poskrbi za hitro prekinitev delovanja Cas9 (angl. self-deleting AAV). Metoda se uporablja pri vnosu z virusnimi vektorji, ko je problem predolge izpostavljenosti, zaradi kontinuirnega izražanja, največji. Temelji na vnosu na dveh vektorjih. Na prvem vektorju je zapis za protein Cas9, na drugem pa sgRNA za tarčno regijo, pa tudi za regiji, ki obdajata zapis za Cas9. Tako se po delovanju sistema sočasno z delovanjem na tarčno regijo tudi izreže protein Cas9. Po rezultatih raziskav to ne vpliva na učinkovitost delovanja sistema, močno pa vpliva na zmanjšanje netarčnih mutacij (Li in sod., 2019; Ruan in sod., 2017).



Slika 8: Uporaba sistema AAV, kjer se Cas9 sam izbriše (Li in sod., 2019).

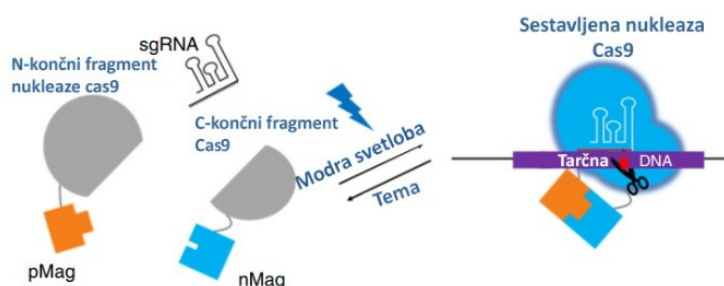
Mogoče pa je uporabiti tudi velik lentivirusni vektor, na katerem je zapis za celoten sistem, ki sestavi potrebne dele za rezanje DNA s Cas9 in kasneje izreže tudi samega sebe in s tem časovno omeji svoje delovanje. sgRNA za Cas9 je pod promotorjem, občutljivim na antibiotik tetraciklin, zato se ta DNA začne prepisovati šele ob njegovem dodatku. To omogoči še večjo fleksibilnost glede časa delovanja sistema CRISPR/Cas9 (Petris in sod., 2017).

6.7.2 Kemično inducibilen CRISPR/Cas9

Tehnologija predstavlja možnost omejitve neželenih učinkov s časovno omejitvijo delovanja nukleaze. Protein Cas9 je razdeljen na dva dela, vsakega s svojim proteinskim adapterjem. Vsak adapter je protein, ki vsebuje vezavne domene za antibiotik rapamicin. V njegovi prisotnosti se adapterja povežeta, kar povzroči dimerizacijo proteina Cas9, ki postane aktiven. Sistem se lahko uporabi tako kot pri klasičnih aplikacijah s popravljalnima mehanizmoma NHEJ/HDR ali pri aplikacijah, ki delujejo na principu dCas9. Neželeni učinki antibiotika zmanjšujejo uporabnost pri kliničnih aplikacijah (Zetsche in sod., 2015).

6.7.3 S svetlobo inducibilen sistem CRISPR/Cas9

Protein Cas9 je enako kot pri kemično inducibilnem sistemu razdeljen na dva dela, vsakega s svojim adapterjem. Pod vplivom modre svetlobe se povežeta, protein pa postane delujoč in katalizira rez DNA. Ko je modra svetloba odstranjena, se protein zopet razdeli v dve nefunkcionalni enoti. Zaradi odsotnosti toksičnih učinkov ima sistem prednosti pred tistimi, ki so kemično inducibilni z npr. rapamicinom, ki povzroča vrsto stranskih učinkov (Nihongaki in sod., 2015)



Slika 9: Mehanizem delovanja s svetlobo inducibilnega sistema CRISPR/Cas9 (Nihongaki in sod., 2015).

7 ZAKLJUČEK

Sistem CRISPR/Cas je v zadnjih letih doživel eksponentni razvoj. V letu 2018 je bilo objavljenih preko 5000 akademskih člankov s ključno besedo CRISPR/Cas. Poleg popularnosti pri raziskavah pa sistem kaže odličen potencial pri kliničnih aplikacijah. Trenutno je v teku že več kliničnih študij, ki želijo s klasičnim načinom delovanja nukleaze, preko HDR (vstavljen popravljen gen) ali NHEJ (izbijanje letalnega gena), pomagati pacientom z različnimi genetskimi boleznimi (anemija srpastih celic, okužba z virusom HIV, različne vrste raka).

Velik klinični potencial pa ostaja za aplikacije z dCas9, saj je sistem zelo fleksibilen in robusten. S kombinacijo novih dognanj iz področij napovedovanja morebitnih netarčnih učinkov, izboljšanja proteina Cas9 in kombinacijo različnih sistemov bo verjetno že v bližnji prihodnosti mogoče z relativno visoko stopnjo varnosti zelo natančno spreminjati genom ali celo epigenom.

8 VIRI

- Amabile A., Migliara A., Capasso P., Biffi M., Cittaro D., Naldini L., Amabile A., Migliara A., Capasso P., Biffi M., Cittaro D., Naldini L. 2016. Inheritable Silencing of Endogenous Genes by Hit- and-Run Targeted Epigenetic Editing Resource Inheritable Silencing of Endogenous Genes by Hit-and-Run Targeted Epigenetic Editing. *Cell*, 167: 219–224
- Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. 2014. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513: 569–573
- Cameron P., Fuller C. K., Donohoue P. D., Jones B. N., Thompson M. S., Carter M. M., Gradia S., Vidal B., Garner E., Slorach E. M., Lau E., Banh L. M., Lied A. M., Edwards L. S., Settle A. H., Capurso D., Llaca V., Deschamps S., Cigan M., Young J. K., May A. P. 2017. Mapping the genomic landscape of CRISPR-Cas9 cleavage. *Nature Methods*, 14: 600–606
- Campistol J. M., Liao H.-K., Lu L.-F., O’Keefe D. D., Sakurai M., Esteban C. R., Sui Y., Yamauchi T., Guillen P., Wu M.-Z., Hatanaka F., Núñez-Delicado E., Araoka T., Wu C.-J., Reddy P., Izpisua Belmonte J. C. 2017. In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation. *Cell*, 171: 1495–1507
- Charlesworth C. T., Deshpande P. S., Dever D. P., Camarena J., Lemgart V. T., Cromer M. K., Vakulskas C. A., Collingwood M. A., Zhang L., Bode N. M., Behlke M. A., Dejene B., Cieniewicz B., Romano R., Lesch B. J., Gomez-Ospina N., Mantri S., Pavel-Dinu M., Weinberg K. I., Porteus M. H. 2019. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nature Medicine*, 25: 249-254
- Chavez A., Scheiman J., Suhani V., Pruitt B. W., Tuttle M., Iyer E., Lin S., Kian S., Guzman C. D., Church G. M. 2015. Highly-efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*, 12: 326–328
- Chew W. L., Cheng J. K. W., Wagers A. J., Tabebordbar M., Mali P., Wu E. Y., Ng A. H. M., Church G. M., Zhu K. 2016. A multifunctional AAV–CRISPR–Cas9 and its host response. *Nature Methods*, 13: 868–874
- Crudele J. M., Chamberlain J. S. 2018. Cas9 immunity creates challenges for CRISPR gene editing therapies. *Nature Communications*, 9: 9–11
- Daya S., Berns K. I. 2008. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical Microbiology Reviews*, 21: 583–593
- Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C. M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z. A., Eckert M. R., Vogel J., Charpentier E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471: 602–607
- Doench J. G., Listgarten J., Hegde M., Wilen C., Root D. E., Donovan K. F., Tothova Z., Doench J. G., Sullender M., Orchard R., Vaimberg E. W., Smith I., Virgin H. W., Fusi N. 2016. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 34: 184–191
- Doudna J. A., Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346: 1077-1084
- Fu Y., Sander J. D., Reyon D., Cascio V. M., Joung J. K. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology*, 32: 279–284

- Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 2579–2583
- Gaudelli N. M., Komor A. C., Rees H. A., Packer M. S., Badran A. H., Bryson D. I., Liu D. R. 2017. Programmable base editing of A T to G C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551: 464–471
- Gilbert L. A., Larson M. H., Morsut L., Liu Z., Brar G. A., Torres S. E., Stern-Ginossar N., Brandman O., Whitehead E. H., Doudna J. A., Lim W. A., Weissman J. S., Qi L. S. 2013. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154: 442–451
- Guilinger J. P., Thompson D. B., Liu D. R. 2014. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nature Biotechnology*, 32: 577–582
- Haft D. H., Selengut J., Mongodin E. F., Nelson K. E. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Computational Biology*, 1: 474–483
- Hilton I. B., D’Ippolito A. M., Vockley C. M., Thakore P. I., Crawford G. E., Reddy T. E., Gersbach C. A. 2015. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology*, 33: 510–517
- Hori T. 2013. Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Scientific Reports*, 292: 1559–1569
- Jin S., Zong Y., Gao Q., Zhu Z., Wang Y., Qin P., Liang C., Wang D., Qiu J.-L., Zhang F., Gao C. 2019. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science*, 8: 1–6
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337: 816–822
- Kennedy E. M., Kornepati A. V. R., Goldstein M., Bogerd H. P., Poling B. C., Whisnant A. W., Kastan M. B., Cullen B. R. 2014. Inactivation of the Human Papillomavirus E6 or E7 Gene in Cervical Carcinoma Cells by Using a Bacterial CRISPR/Cas RNA-Guided Endonuclease. *Journal of Virology*, 88: 11965–11972
- Kim D., Bae S., Park J., Kim E., Kim S., Yu H. R., Hwang J., Kim J. Il, Kim J. S. 2015. Digenome-seq: Genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nature Methods*, 12: 237–243
- Kim D., Kim J. S. 2018. DIG-seq: A genome-wide CRISPR off-target profiling method using chromatin DNA. *Genome Research*, 28: 1882–1893
- Kleinstiver B. P., Prew M. S., Tsai S. Q., Topkar V. V., Nguyen N. T., Zheng Z., Gonzales A. P. W., Li Z., Peterson R. T., Yeh J. R. J., Aryee M. J., Joung J. K. 2015. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 523: 481–485
- Komor A. C., Kim Y. B., Packer M. S., Zuris J. A., Liu D. R. 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533: 420–

- Komor A. C., Zhao K. T., Packer M. S., Gaudelli N. M., Waterbury A. L., Koblan L. W., Kim Y. B., Badran A. H., Liu D. R. 2017. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Science Advances*, 3: 1–10
- Konermann S., Brigham M. D., Trevino A. E., Joung J., Abudayyeh O. O., Barcena C., Hsu P. D., Habib N., Gootenberg J. S., Nishimasu H., Nureki O., Zhang F. 2015. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517: 583–588
- Kuscu C., Parlak M., Tufan T., Yang J., Szlachta K., Wei X., Mammadov R., Adli M. 2017. CRISPR-STOP : gene silencing through nonsense mutations. *Nature Publishing Group*, 14: 2–6
- Labuhn M., Adams F. F., Ng M., Knoess S., Schambach A., Charpentier E. M., Schwarzer A., Mateo J. L., Klusmann J. H., Heckl D. 2018. Refined sgRNA efficacy prediction improves large and small-scale CRISPR-Cas9 applications. *Nucleic Acids Research*, 46: 1375–1385
- Lee K., Conboy M., Park H. M., Jiang F., Kim H. J., Dewitt M. A., Mackley V. A., Chang K., Rao A., Skinner C., Shobha T., Mehdipour M., Liu H., Huang W., Lan F., Bray N. L., Li S., Corn J. E., Kataoka K., Doudna J. A., Conboy I., Murthy N. 2017. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nature Biomedical Engineering*, 1: 889–90
- Li A., Lee C. M., Hurley A. E., Jarrett K. E., De Giorgi M., Lu W., Balderrama K. S., Doerfler A. M., Deshmukh H., Ray A., Bao G., Lagor W. R. 2019. A Self-Deleting AAV-CRISPR System for In Vivo Genome Editing. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 12: 111–122
- Lin J., Wong K. C. 2018. Off-target predictions in CRISPR-Cas9 gene editing using deep learning. *Bioinformatics*, 34: 656–66
- Listgarten J., Kleinstiver B. P., Gao K., Elibol M., Weinstein M., Joung J. K., Fusi N., Crawford J., Hoang L., Doench J. G., Sousa A. A. 2018. Prediction of off-target activities for the end-to-end design of CRISPR guide RNAs. *Nature Biomedical Engineering*, 2: 38–47
- Liu X. S., Wu H., Ji X., Dadon D., Young R. A., Liu X. S., Wu H., Ji X., Stelzer Y., Wu X., Czauderna S., Shu J., Dadon D. 2016. Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome Resource Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell*, 167: 233–235
- Ma Y., Zhang J., Yin W., Zhang Z., Song Y., Chang X. 2016. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nature Methods*, 13: 1029–1035
- Maeder M. L., Linder S. J., Cascio V. M., Fu Y., Ho Q. H., Joung J. K. 2013. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature Methods*, 10: 977–979
- Makarova K. S., Grishin N. V., Shabalina S. A., Wolf Y. I., Koonin E. V. 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 1: 1–26

- Moreno A. M., Fu X., Zhu J., Katrekar D., Shih Y. R. V., Marlett J., Cabotaje J., Tat J., Naughton J., Lisowski L., Varghese S., Zhang K., Mali P. 2018. In Situ Gene Therapy via AAV-CRISPR-Cas9-Mediated Targeted Gene Regulation. *Molecular Therapy*, 26: 1818–182
- Morita S., Noguchi H., Horii T., Nakabayashi K., Kimura M., Okamura K., Sakai A., Nakashima H., Hata K., Nakashima K., Hatada I. 2016. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9 – peptide repeat and scFv – TET1 catalytic domain fusions. *Nature Biotechnology*, 34, 10: 1060-1065
- Nihongaki Y., Kawano F., Nakajima T., Sato M. 2015. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nature Biotechnology*, 33: 755–760
- Nishimasu H., Ran F. A., Hsu P. D., Konermann S., Shehata S. I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156: 935–949
- Nishimasu H., Shi X., Noda T., Zhang F., Aburatani H., Nureki O., Ishitani R., Nishimasu H., Ishiguro S., Seki M., Abudayyeh O. O., Holmes B., Tanaka M., Yachie N., Okazaki S., Oura S., Mori H., Gootenberg J. S., Hirano H., Ikawa M., Hirano S., Gao L. 2018. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*, 361: 1259–1262
- Nyerges Á., Csörgő B., Draskovits G., Kintses B., Szili P., Ferenc G., Révész T., Ari E., Nagy I., Bálint B., Vásárhelyi B. M., Bihari P., Számel M., Balogh D., Papp H., Kalapis D., Papp B., Pál C. 2018. Directed evolution of multiple genomic loci allows the prediction of antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115: 5726–5735
- Petris G., Montagna C., Cereseto A., Conti L., Casini A., Zasso J., Prandi D., Romanel A., Lorenzin F., Demichelis F. 2017. Hit and go CAS9 delivered through a lentiviral based self-limiting circuit. *Nature Communications*, 8, 15334, doi:10.1038/ncomms15334
- Platt R. J., Chen S., Zhou Y., Yim M. J., Swiech L., Kempton H. R., Dahlman J. E., Parnas O., Eisenhaure T. M., Jovanovic M., Graham D. B., Jhunjhunwala S., Heidenreich M., Xavier R. J., Langer R., Anderson D. G., Hacohen N., Regev A., Feng G., Sharp P. A., Zhang F. 2014. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 159: 440–455
- Qi L. S., Larson M. H., Gilbert L. A., Doudna J. A., Weissman J. S., Arkin A. P., Lim W. A. 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152: 1173–1183
- Ramakrishna S., Kwaku Dad A. B., Beloor J., Gopalappa R., Lee S. K., Kim H. 2014. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Research*, 24: 1020–1027
- Ran F. A., Hsu P. D., Lin C. Y., Gootenberg J. S., Konermann S., Trevino A. E., Scott D. A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154: 1380–1389
- Ruan G. X., Barry E., Yu D., Lukason M., Cheng S. H., Scaria A. 2017. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10. *Molecular Therapy*, 25: 331–341
- Samulski R. J., Muzyczka N. 2014. AAV-Mediated Gene Therapy for Research and

- Therapeutic Purposes. *Annual Review of Virology*, 1: 427–451
- Sapranaukas R., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 39: 9275–9283
- Slaymaker I. M., Yan W. X., Gao L., Zhang F., Scott D. A., Zetsche B. 2015. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351: 84–88
- Stemmer M., Thumberger T., del Sol Keyer M., Wittbrodt J., Mateo J. L. 2015. CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *Plos One*, 10, 4, doi:10.1371/journal.pone.0124633
- Sun N., Rees H. A., Geurts M. H., Hu J. H., Liu D. R., Tang W., Miller S. M., Lin Z., Gao X., Chen L., Zeina C. M. 2018. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 556: 57–63
- Tan J., Zhang F., Karcher D., Bock R. 2019. Engineering of high-precision base editors for site-specific single nucleotide replacement. *Nature Communications*, 10, 439, doi:10.1038/s41467-018-08034-8
- Tanenbaum M. E., Gilbert L. A., Qi L. S., Weissman J. S., Vale R. D. 2014. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, 159: 635–46
- Truong D. J. J., Kühner K., Kühn R., Werfel S., Engelhardt S., Wurst W., Ortiz O. 2015. Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy. *Nucleic Acids Research*, 43: 6450–6458
- Tsai S. Q., Joung J. K. 2016. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 17: 300–312
- Tsai S. Q., Nguyen N. T., Malagon-Lopez J., Topkar V. V., Aryee M. J., Joung J. K. 2017. CIRCLE-seq: A highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nature Methods*, 14: 607–614
- Tsai S. Q., Wyvekens N., Khayter C., Foden J. A., Thapar V., Reyon D., Goodwin M. J., Aryee M. J., Joung J. K. 2014. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, 32: 569–576
- Tsai S. Q., Zheng Z., Nguyen N. T., Liebers M., Topkar V. V., Thapar V., Wyvekens N., Khayter C., Iafrate A. J., Le L. P., Aryee M. J., Joung J. K. 2015. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nature Biotechnology*, 33: 187–198
- Vojta A., Tadić V., Bočkor L., Dobrinić P., Kora P., Zoldoš V., Julg B., Klasić M. 2016. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 44: 5615–5628
- Wagner D. L., Akyüz L., Reinke P., Volk H.-D., Schmueck-Henneresse M., Burkhardt L.-M., Wendering D. J., Amini L. 2018. High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population. *Nature Medicine*, 25: 242–248
- Wang D., Mou H., Li S., Li Y., Li J., Xue W., Hough S., Gao G., Weng Z., Sontheimer E. J., Tran K., Yin H., Anderson D. G. 2015. Adenovirus-Mediated Somatic Genome Editing of

- Pten by CRISPR/Cas9 in Mouse Liver in Spite of Cas9-Specific Immune Responses. *Human Gene Therapy*, 26: 432–442
- Xu X., Tao Y., Gao X., Zhang L., Li X., Zou W. 2016. A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation. *Cell discovery*, 2, 16009, doi: 10.1038/celldisc.2016.9
- Yan W. X., Mirzazadeh R., Garnerone S., Scott D., Schneider M. W., Kallas T., Custodio J., Wernersson E., Li Y., Gao L., Federova Y., Zetsche B., Zhang F., Bienko M., Crosetto N. 2017. BLISS is a versatile and quantitative method for genome-wide profiling of DNA double-strand breaks. *Nature Communications*, 8: 1–9
- Yang H., Wang H., Shivalila C. S., Cheng A. W., Shi L., Jaenisch R. 2013. XOne-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell*, 154: 1370–1379
- Zetsche B., Volz S. E., Zhang F. 2015. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nature Biotechnology*, 33: 139–142
- Zhang Y., Yin C., Hu W., Fagan P. R., Young W.-B., Kaminski R., Zhang Y., Zhang T., Putatunda R., Khalili K., Li F., Yang W. 2015. CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Scientific Reports*, 5: 1–14
- Zuo E., Sun Y., Wei W., Yuan T., Ying W., Sun H., Yuan L., Steinmetz L. M., Li Y., Yang H. 2019. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*, 126: 1–6