

Received: 2015.10.14
Accepted: 2016.05.20
Published: 2016.09.01

System CRISPR-Cas – od odporności bakterii do inżynierii genomowej

The CRISPR-Cas system – from bacterial immunity to genome engineering

Maria Czarnek, Joanna Bereta

Zakład Biochemii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie*

Streszczenie

Precyzyjne modyfikacje genomów wprowadzane z dużą wydajnością są istotne do zrozumienia, jaki wpływ na procesy biologiczne i stany chorobowe mają konkretne geny lub inne elementy genomu. W ostatnich latach pojawiły się nowe metody swoistych modyfikacji genomów, określane jako edycja genomu a wykorzystujące tzw. „programowane” nukleazy. Prawdziwą rewolucję w edycji genomu przyniosło zastosowanie systemu CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated), w którym główną rolę odgrywa jedna z tego typu nukleaz, Cas9. System wykorzystuje elementy mechanizmu nabytej odporności bakterii i archeonów na infekcję fagami i transformację obcym materiałem genetycznym. Mikroorganizmy włączają do loci CRISPR w swoim genomie fragmenty obcego DNA, co umożliwia w przyszłości szybkie rozpoznanie i zwalczanie infekcji. Istnieje kilka typów CRISPR-Cas wśród prokariotów, jednak w inżynierii genomowej zastosowanie znalazły narzędzia oparte na systemie CRISPR typu II. CRISPR-Cas typu II wykorzystuje małe cząsteczki RNA (crRNA i tracrRNA) do precyzyjnego nakierowania pojedynczej nukleazy efektorowej – Cas9 – na konkretne miejsce w genomie. To miejsce to sekwencja komplementarna do crRNA. Cas9 może być wykorzystana do: (i) wprowadzania trwałych zmian w genomie (typu knock-out i knock-in) m.in. w procesach modyfikacji genetycznych zwierząt lub linii komórkowych, (ii) aktywacji bądź wyciszenia ekspresji wybranych genów czy (iii) wizualizacji konkretnych miejsc w genomie żywych komórek. Narzędzia oparte na systemie CRISPR-Cas znalazły zastosowanie przy tworzeniu zwierzęcych i komórkowych modeli wielu chorób, np. konkretnych typów nowotworów. W przyszłości, edycja genomu wykorzystująca programowane nukleazy może znaleźć szerokie zastosowanie w medycynie m.in. do walki z chorobami o podłożu genetycznym, a także w terapii osób zakażonych wirusem HIV.

Słowa kluczowe:

CRISPR-Cas • edycja genomu • programowane nukleazy

Summary

Precise and efficient genome modifications present a great value in attempts to comprehend the roles of particular genes and other genetic elements in biological processes as well as in various pathologies. In recent years novel methods of genome modification known as genome editing, which utilize so called “programmable” nucleases, came into use. A true revolution in genome editing has been brought about by the introduction of the CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated) system, in which one of such nucleases, i.e. Cas9, plays a major role. This system is based on the elements of the bacterial and archaeal mechanism responsible for acquired immunity against phage infections and transfer of foreign genetic material. Microorganisms incorporate fragments of foreign DNA into CRISPR loci present in their genomes, which enables fast recognition and elimina-

| | |
|-----------------------|---|
| | tion of future infections. There are several types of CRISPR-Cas systems among prokaryotes but only elements of CRISPR type II are employed in genome engineering. CRISPR-Cas type II utilizes small RNA molecules (crRNA and tracrRNA) to precisely direct the effector nuclease – Cas9 – to a specific site in the genome, i.e. to the sequence complementary to crRNA. Cas9 may be used to: (i) introduce stable changes into genomes e.g. in the process of generation of knock-out and knock-in animals and cell lines, (ii) activate or silence the expression of a gene of interest, and (iii) visualize specific sites in genomes of living cells. The CRISPR-Cas-based tools have been successfully employed for generation of animal and cell models of a number of diseases, e.g. specific types of cancer. In the future, the genome editing by programmable nucleases may find wide application in medicine e.g. in the therapies of certain diseases of genetic origin and in the therapy of HIV-infected patients. |
| Key words: | CRISPR-Cas • genome editing • programmable nucleases |
| Full-text PDF: | http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1216379 |
| Word count: | 5483 |
| Tables: | – |
| Figures: | 5 |
| References: | 97 |

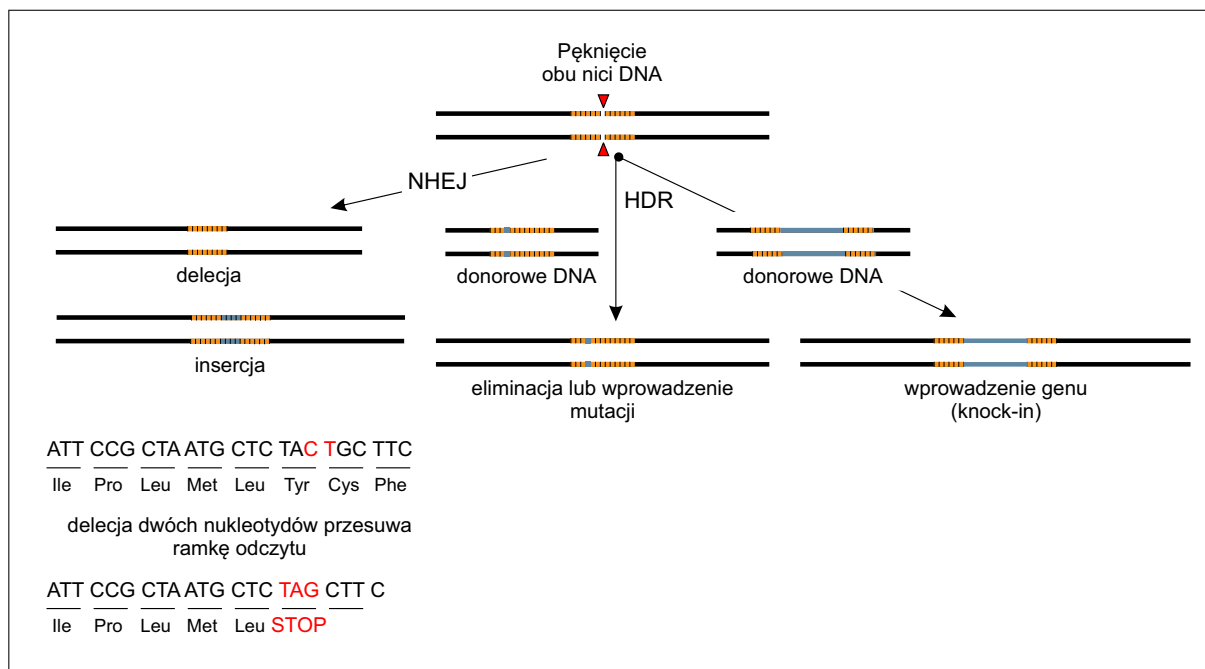
Adres autorki: dr hab. Joanna Bereta, Zakład Biochemii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków;
e-mail: joanna.bereta@uj.edu.pl

WPROWADZENIE

Klasyczna metoda inaktywacji bądź wprowadzenia dodatkowych genów (knock-out i knock-in) w organizmach zwierzęcych polega na ukierunkowanej modyfikacji DNA w macierzystych komórkach embrionalnych (ESC, embryonic stem cells) z wykorzystaniem zjawiska rekombinacji homologicznej [10]. Wprowadzany obcy DNA (np. gen oporności na antybiotyk, gdy celem jest uzyskanie zwierząt knock-out lub gen oporności na antybiotyk wraz z sekwencją kodującą, o którą wzbogaca się genom zwierząt knock-in) otoczony jest sekwencjami homologicznymi do DNA w miejscu pożądanej integracji. Główną przeszkodą w uzyskiwaniu szczepów zwierząt ze swoistymi modyfikacjami jest niska wydajność integracji transgenu w swoistym locus, np. dla mysich ESC szacowana na 10^{-5} - 10^{-7} [10]. Wiele czynników może wpływać na częstotliwość swistej integracji, np. metoda wprowadzania wektorów do komórek czy długość ramion homologii matrycy donorowej [10,81].

Badania prowadzone pod koniec lat 80. i z początkiem lat 90. ub.w. wykazały, że dwuniciowe pęknięcie helisy DNA (DSB, double-strand break) w obrębie sekwencji docelowej drastycznie zwiększa częstotliwość rekombinacji homologicznej [71,72]. Pęknięcia DNA w komórkach eukariotycznych są naprawiane w dwojaki sposób: przez łączenie nici w procesie niehomologicznej naprawy rekombinacyjnej (NHEJ, non-homologous end joining)

lub przez rekombinację homologiczną (ryc. 1). Modyfikacje genomu z użyciem programowanych nukleaz opierają się na katalizowaniu powstawania dwuniciowych pęknięć w helisie DNA przez te enzymy w miejscu wybranym przez eksperymentatora i są określane jako edycja genomu (genome editing). Historia edycji genomu komórek ssaczych miała początek w latach 90. ub.w. Po raz pierwszy wykazano wtedy możliwość modyfikacji genomu z użyciem endonukleaz, określanych jako samonaprowadzające endonukleazy (homing endonucleases), znalezionych u prokariotów i niższych eukariotów. Białka te nazywa się również meganukleazami, ze względu na to, że rozpoznają długie sekwencje w DNA, liczące 14-40 par zasad. Dobrze poznanymi meganukleazami są m.in. enzymy: I-SceI, obecny w mitochondriach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [35] czy I-CreI, którego występowanie opisano w chloroplastach zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii* [79]. Znacząca długość rozpoznawanej sekwencji jest zarówno zaletą jak i największym ograniczeniem w stosowaniu meganukleaz. Zaletą, gdyż warunkuje dużą swoistość, a co za tym idzie niewielką genotoksyczność po wprowadzeniu meganukleaz do komórek ssaczych; ograniczenie, gdyż rozpoznawane przez nie sekwencje występują ekstremalnie rzadko w genomie komórek ssaczych. Próby stworzenia nowych meganukleaz rozpoznających pożądane sekwencje nie przyniosły dobrych rezultatów, głównie przez brak jasnego powiązania między sekwencją aminokwasową meganukleaz a swoistością rozpoznawania konkretnej sekwencji DNA.



Ryc. 1. Schemat wprowadzania mutacji z wykorzystaniem programowanych nukleaz. Gdy genomowy DNA ulega hydrolizie (czerwone strzałki), powstające dwuniciowe pęknięcia (DSB) może być naprawiane w procesach niehomologicznej naprawy rekombinacyjnej (NHEJ) lub rekombinacji homologicznej (HDR). NHEJ może skutkować usunięciem bądź wprowadzeniem dodatkowych nukleotydów. Mutacje typu indel w obrębie sekwencji kodującej białko mogą prowadzić do przesunięcia ramki odczytu i pojawienia się przedwczesnych kodonów STOP. W przypadku naprawy poprzez rekombinację homologiczną egzogenna nić donorowa może być wykorzystana do wprowadzenia ściśle zdefiniowanych zmian w genomie, dzięki czemu możliwe jest wprowadzenie bądź usunięcie mutacji punktowej czy wprowadzenie dodatkowego genu w wybranym *locus* (knock-in)

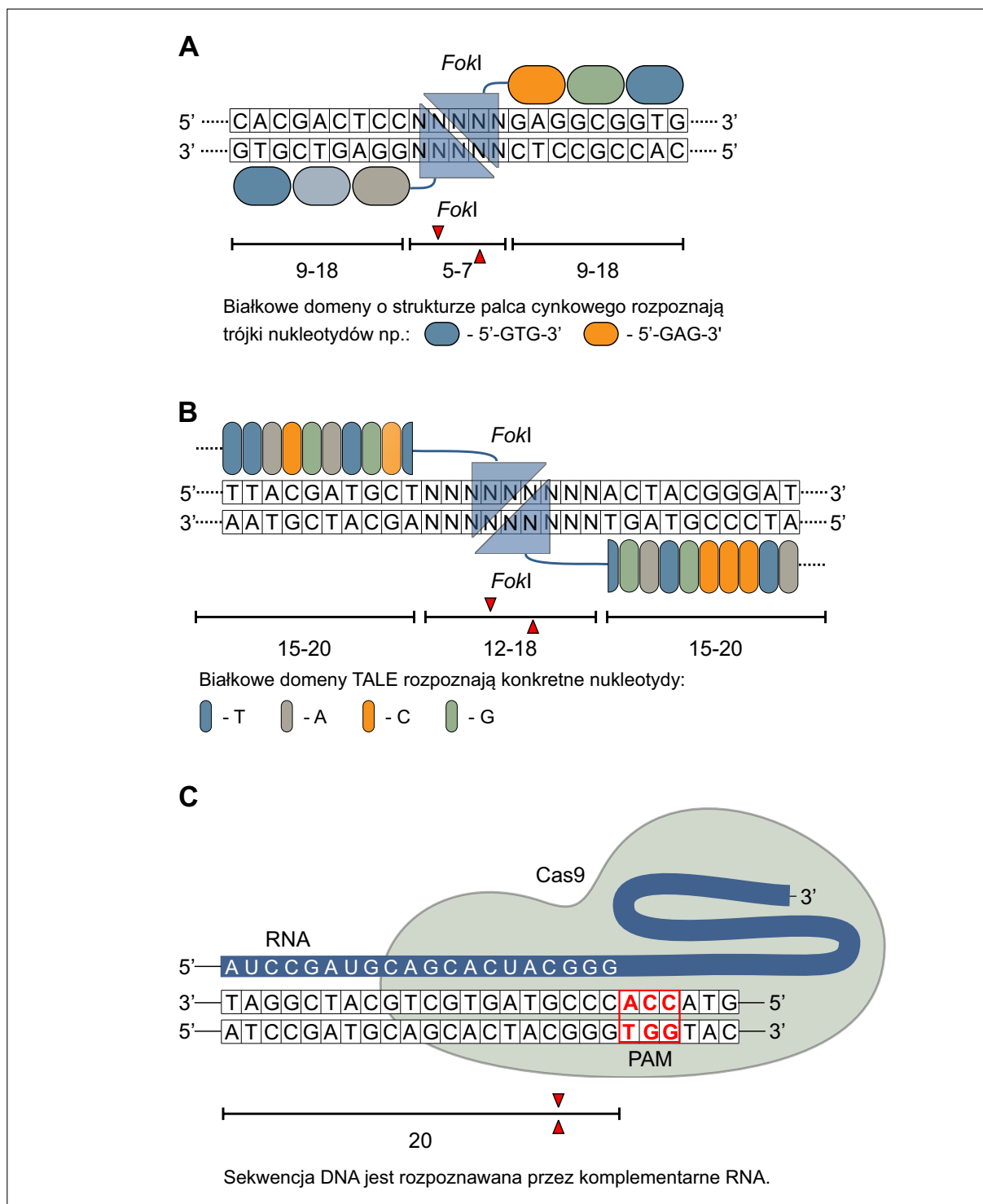
PROGRAMOWANE NUKLEAZY

Przełomem okazało się stworzenie nukleaz z domeną palca cynkowego (zinc finger nucleases, ZFN). ZFN to białka fuzyjne, łączące domeny wiążące DNA bazujące na eukariotycznych czynnikach transkrypcyjnych z działającą nieswoiście domeną nukleazową enzymu restrykcyjnego klasy IIS, *FokI* (ryc. 2). Domena *FokI* odpowiedzialna za hydrolizę DNA jest aktywna tylko jako dimer [4]. Aby doszło do wygenerowania pęknięć w helisie DNA jest potrzebna para ZFN, w której każda z domen wiążących DNA rozpoznaje sekwencję o długości 9-18 par zasad. Stworzenie białek rozpoznających konkretną sekwencję jest zazwyczaj trudne, czasochłonne i kosztowne w związku z koniecznością stworzenia osobnej pary białek dla każdej targetowanej sekwencji. ZFN charakteryzują się także dość znaczną cytotoxycywnością, związaną najczęściej ze zjawiskiem niepożądanego hydrolizy innych niż targetowana, lecz podobnych do niej, sekwencji w genomie, tzw. sekwencji off-target [17].

W ciągu ostatnich kilku lat możliwości edycji genomu poszerzyły się o narzędzia, takie jak białka TALEN (TALE nucleases) [6]. Nukleazy te są podobne do ZFN, jednak domeny z motywem palca cynkowego zostały zastąpione domenami wiążącymi DNA z białek bakterii z rodzaju *Xanthomonas*. Bakterie *Xanthomonas*, będące patogenami roślin, wykorzystują białka TALE (transcription activa-

tor-like effectors) do regulacji transkrypcji w komórkach gospodarza. Domena wiążąca DNA białka TALE składa się z kilkunastu do kilkudziesięciu powtórzeń sekwencji 33-35 aminokwasów, z których każdy segment jest odpowiedzialny za rozpoznawanie pojedynczej pary zasad w DNA (ryc. 2). Dzięki prostemu kodowi odpowiadającemu za rozpoznawanie poszczególnych nukleotydów w DNA, technologia wykorzystująca TALEN charakteryzuje się dużą skutecznością w tworzeniu funkcjonalnych nukleaz. Ponadto, białka TALEN charakteryzują się mniejszą cytotoxycywnością w porównaniu do ZFN [60]. Cechy te zadecydowały o popularności nukleaz TALEN jako narzędzi do precyzyjnej edycji genomu komórek eukariotycznych.

Alternatywą powyższych metod jest system CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated), w którym za swoistość rozpoznawania DNA odpowiada nie jak w przypadku ZFN czy TALEN białko, ale krótka, komplementarna cząsteczka RNA (ryc. 2). Jest to dość powszechny system odporności nabytej bakterii i archeonów przeciwko obcym elementom genetycznym, jak plazmidy czy wirusowe kwasy nukleinowe [86]. *Loci* CRISPR zidentyfikowano w genomach około 45% bakterii i 83% archeonów [59]. Zwykle organizmy mają jeden lub dwa *loci* CRISPR, chociaż u archeona *Methanocaldococcus jannaschii* zidentyfikowano aż 18 różnych *loci* CRISPR[9].



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie wiązania ZFN, TALEN oraz komponentów systemu CRISPR-Cas do DNA. (A) Monomer ZFN składa się typowo z trzech do sześciu domen z motywem palca cynkowego (ZFP, zinc finger protein) oraz domeny nukleazowej FokI. Hydroliza DNA przez ZFN wymaga dimeryzacji FokI, w związku z czym potrzebna jest para ZFN rozpoznająca DNA oddzielone od siebie sekwencją o długości 5-7 pz. Każda z domen ZFP rozpoznaje specyficzną trójkę nukleotydów. (B) Monomer TALEN składa się zazwyczaj z 15-20 domen wiążących DNA białek TALE oraz domeny nukleazowej FokI. Podobnie jak ZFN, nukleazy TALEN hydrolizują DNA jedynie jako dimery, przy czym rozpoznawane DNA musi być oddzielone od siebie sekwencjami o długości 12-18 pz. Każda domena TALE odpowiada za rozpoznawanie jednego nukleotydu. (C) W systemie CRISPR-Cas za rozpoznawanie docelowej sekwencji odpowiada mała cząsteczka RNA – sgRNA – komplementarna do targetowanego DNA. Długość typowej rozpoznawanej sekwencji wynosi 20 nukleotydów. Targetowane DNA musi sąsiadować z motywem PAM (5'-NGG; N – dowolny nukleotyd). Hydroliza DNA zachodzi z udziałem nukleazy Cas9; każda z nici DNA ulega przecięciu przez odmienną domenę katalityczną w obrębie Cas9. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca hydrolizy DNA

HISTORIA BADAŃ NAD SYSTEMEM CRISPR-CAS

Elementy systemu CRISPR po raz pierwszy zidentyfikowano w 1987 r. [86]. Opisano wtedy występowanie w genomie *Escherichia coli loci* złożonych z 29-nukleotydowych powtórzeń prostych (direct repeats) zawierających sekwencje palindromowe, porozdzielanych przez 32-nukleotydowe różnorodne odcinki DNA – sekwencje rozdzielające (spacers). W późniejszych latach podobne *loci*, choć różniące się długością sekwencji powtórzonych i rozdzielających znaleziono u innych gatunków bakterii. *Loci* takie są poprzedzone lub oflankowane genami białek Cas, a obecność niektórych Cas stanowi podstawę do podziału *loci* CRISPR na trzy typy (zob. niżej). Funkcja *loci* CRISPR pozostawała nieznana, dopóki nie zauważono, że sekwencje rozdzielające są identyczne z plazmidowym czy wirusowym DNA [7,58]. Doniesienia te pozwoliły wysunąć hipotezę, że CRISPR jest śladem po infekcjach i pełni rolę systemu odporności przeciwko infekcjom fagowym i inwazji obcych elementów genetycznych [7]. Barrangou i wsp. wykazali, że integracja krótkiej sekwencji DNA fagowego do *locus* CRISPR bakterii *Streptococcus thermophilus* zapewnia odporność na infekcję fagiem, z którego pochodziła włączona sekwencja, a także innym, blisko spokrewnionym wirulentnym bakteriofagiem zawierającym w genomie sekwencję o stuprocentowej zgodności do tej zintegrowanej z *locus* CRISPR [2]. Ponadto wykazano, że insercja bądź delecja sekwencji wywodzących się z fagowego DNA koreluje odpowiednio ze zmniejszoną bądź zwiększoną podatnością na infekcję tym fagiem [2]. Dalsze eksperymenty potwierdziły udział CRISPR w degradacji obcych kwasów nukleinowych: głównie DNA, ale także RNA [30,73].

CRISPR-CAS JAKO SYSTEM NABYTEJ ODPORNOŚCI MIKROORGANIZMÓW – MECHANIZM DZIAŁANIA

W działaniu systemu CRISPR-Cas można wyróżnić trzy zasadnicze etapy: adaptację, ekspresję i interferencję (ryc. 3). Podczas adaptacji, krótki fragment pochodzący z wirusowego lub plazmidowego DNA (tzw. protospacer) jest włączany do *locus* CRISPR [2,25]. Długość włączanych sekwencji różni się znacznie między organizmami i wynosi 21-72 nukleotydów; najczęściej są to fragmenty 32-38-nukleotydowe. Insercja zachodzi preferencyjnie na jednym z końców *locus*, tzw. końcu liderowym (leader end); każdej integracji towarzyszy duplikacja końcowej sekwencji powtórzonych tak, aby zachowana została architektura: powtórzenie proste-sekwencja rozdzielająca-powtórzenie proste [94]. Długość powtórzeń prostych także jest gatunkowo swoista i wynosi 24-47 nukleotydów, chociaż typowo mieści się w przedziale 28-37 nukleotydów [28]. Dokładny mechanizm integracji nowych sekwencji rozdzielających i duplikacji końcowego powtórzenia nie jest znany; postuluje się udział białek Cas w tym procesie. Jako najistotniejsze wskazuje się dwie endonukleazy: Cas1 oraz Cas2 [2,8,25,94]. Za ich udziałem w procesie przemawia to, że włączanie nowych sekwencji rozdzielających jest niemożliwe w przypadku mutacji *cas1* i *cas2* [19]. Ponadto, białka Cas1 i Cas2 są

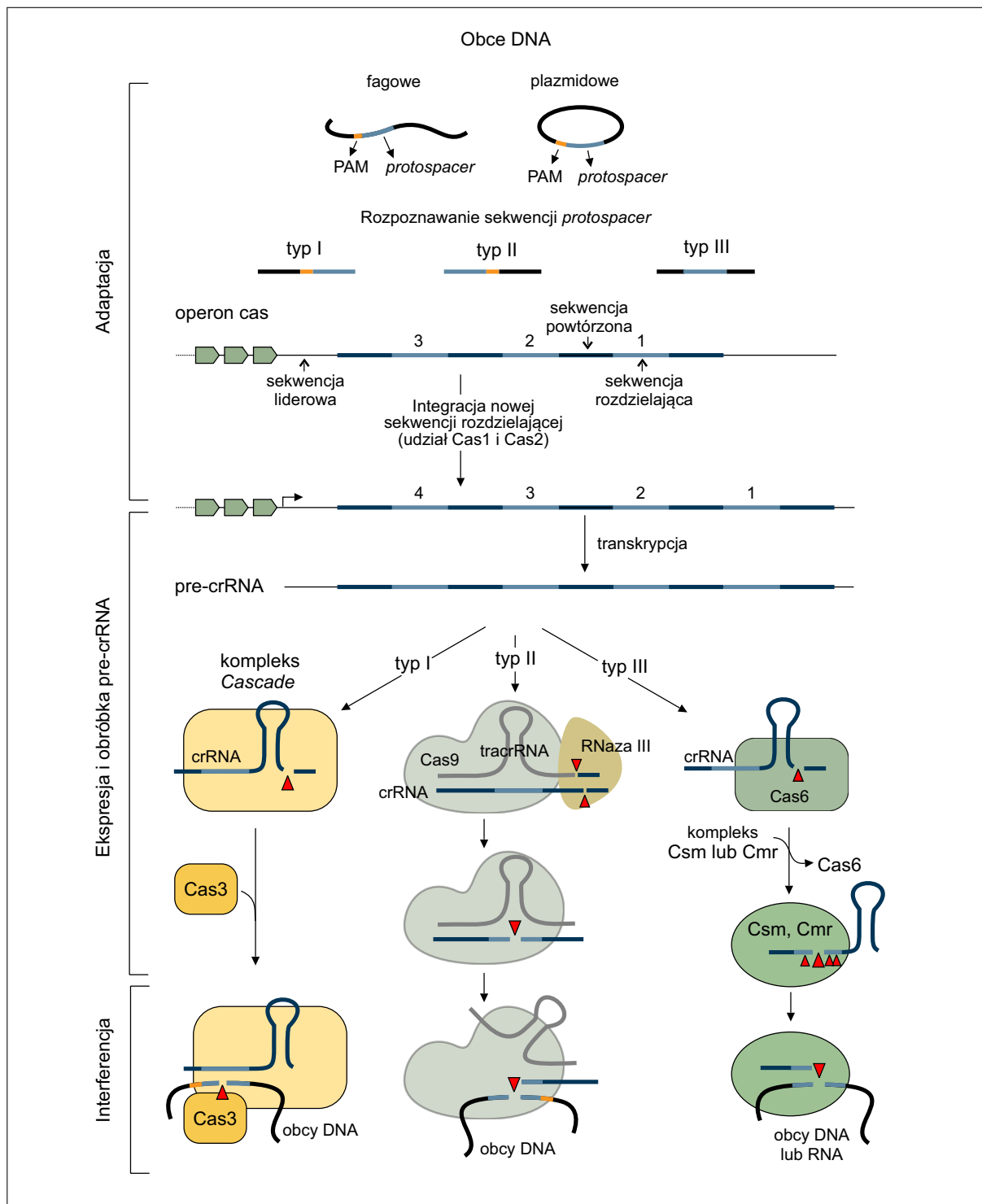
zbędne w pozostałych procesach związanych z biogenezą i działaniem komponentów systemu CRISPR-Cas [8,20]. Wybór sekwencji, która ma zostać włączona do *locus* CRISPR (na tym etapie określanej jako prekursor sekwencji rozdzielającej, protospacer) zdaje się być podyktowany obecnością motywu PAM (protospacer adjacent motif) na jednym z końców tej sekwencji [25,57]. Motywy PAM składają się z kilku nukleotydów (zazwyczaj 2-5) i różnią się od siebie w zależności od typu systemu CRISPR-Cas [57]. Konieczność występowania PAM na końcu sekwencji protospacer dla systemu CRISPR typu II wykazali Deveau i wsp. dowodząc, że mutacje fagowego DNA w obrębie sekwencji PAM pozwalają wirusowi uniknąć inaktywacji przez enzymy gospodarza [21]. Brak motywu PAM w obrębie powtórzeń prostych w genomie bakterii chroni bakteryjny DNA przed hydrolizą przez komponenty systemu CRISPR-Cas (przynajmniej w przypadku typu I i II) [85].

Następnym krokiem, po etapie adaptacji, jest ekspresja. Powstaje wtedy długi pierwotny transkrypt, obejmujący wszystkie sekwencje powtórzone i wszystkie sekwencje rozdzielające, który podlega obróbce do dojrziałych CRISPR RNA (crRNA), częściowo komplementarnych do sekwencji obcych elementów genetycznych [8]. Dojrzewanie prekursorowego RNA jest katalizowane przez endorybonukleazy działające albo w wielopodjednostkowym kompleksie, np. w kompleksie Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defence) zidentyfikowanym w *E. coli* [8] lub jako pojedyncze enzymy, np. nukleaza Cas6 w *Pyrococcus furiosus* [11]. Badając system CRISPR-Cas bakterii *Streptococcus pyogenes* odkryto mechanizm dojrzewania prekursorowego RNA kierowany przez cząsteczkę małego RNA, kodowanego w *locus* CRISPR, o sekwencji częściowo komplementarnej z pre-crRNA, nazwanego tracrRNA (trans-activating crRNA) [20]. W tym przypadku hydroliza pre-crRNA jest katalizowana przez bakteryjną RNazę III w obecności Cas9.

Ostatnim etapem procesu jest interferencja prowadząca do degradacji obcego materiału genetycznego. W wyniku asocjacji crRNA z białkami Cas powstają kompleksy rybonukleoproteinowe zdolne do rozpoznawania swoistych sekwencji kwasów nukleinowych i hydrolizy wiązań fosfodiesterowych w ich obrębie. Rozpoznawanie obcych elementów genetycznych polega na oddziaływaniu crRNA z komplementarną sekwencją w obcym DNA (stanowiącą jedną z nici sekwencji protospacer) lub w obcym transkrypcie. Sekwencja ta może być obecna zarówno w obszarze kodującym białko jak i poza nim [2,8]. W wyniku działania nukleaz z rodziny Cas obie nici obcego DNA w obrębie sekwencji komplementarnej do crRNA ulegają przecięciu [25].

PODZIAŁ SYSTEMÓW CRISPR-CAS

Systemy CRISPR-Cas zostały podzielone na trzy główne typy (typ I, II i III) oraz dwanaście podtypów, w zależności od organizacji i zawartości genetycznej danego *locus*, a także od mechanizmu działania [52]. Wystę-



Ryc. 3. Biogeneza i działanie komponentów systemu CRISPR-Cas. Po infekcji komórki fagiem lub obcym plazmidem, fragment DNA wirusowego lub plazmidowego jest włączany do locus CRISPR w genomie gospodarza (etap adaptacji). Fragment obcego DNA włączony do locus CRISPR, określany jako sekwencja rozdzielająca, otoczony jest przez identyczne, kilkudziesięcionukleotydowe fragmenty, będące powtórzeniami prostymi. W kolejnym etapie – ekspresji – powstaje pierwotny transkrypt, obejmujący wszystkie sekwencje rozdzielające i powtórzenia proste. W typie I i III, pre-crRNA jest przecinane przez odpowiednie endonukleazy w obrębie powtórzeń prostych, w wyniku czego powstają cząsteczki crRNA. W locus typu III, crRNA są dodatkowo przecinane w odstępach 6-nukleotydowych przez nieznaną nukleazę, tworząc populację dojrzałych crRNA o różnej długości. W przypadku locus typu II, dojrzewanie pre-crRNA wymaga obecności transaktywującego RNA (tracrRNA). tracrRNA hybridyzuje z sekwencjami odpowiadającymi powtórzeniom prostym w pre-crRNA. Duplex taki jest trawiony przez bakteryjną RNazę III w obecności nukleazy Cas9, tworząc dojrzałe cząsteczki crRNA. Na etapie interferencji dochodzi do trawienia obcego DNA (i/lub RNA w typie III) w wyniku działania wielopodjednostkowego kompleksu (typy I i III) lub pojedynczej nukleazy (typ II)

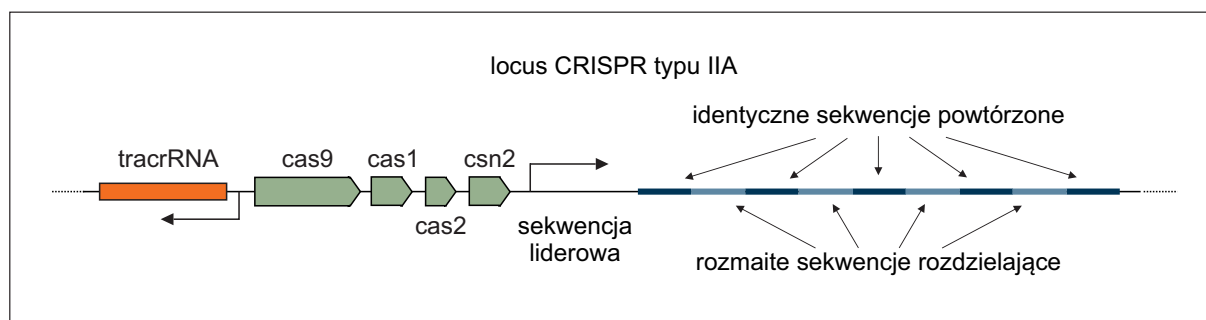
powanie genów *cas1* i *cas2* jest wspólne dla wszystkich trzech typów; obecność genu *cas3*, *cas9* lub *cas10* stanowi wyznacznik przynależności do odpowiedniego typu I, II i III. *Loci* CRISPR typu II zidentyfikowano jedynie w szczepach bakteryjnych, natomiast *loci* typu I i III znajdowane są zarówno u bakterii jak i archeonów. W systemach typu I i III w rozpoznawaniu i niszczeniu obcego kwasu nukleinowego uczestniczą duże kompleksy białek związane z crRNA.

W systemie CRISPR-Cas typu I za obróbkę prekursorowego RNA odpowiadają endorybonukleazy z rodziny Cas6. Rozpoznanie sekwencji docelowej odbywa się z udziałem wielopodjednostkowego kompleksu Cascade. Za trawienie docelowej sekwencji jest odpowiedzialne białko niewchodzące w skład kompleksu Cascade, Cas3 [74]. Motyw PAM jest obecny na końcu 5' tej nici DNA sekwencji protospacer, która jest (znaczeniowo) identyczna z crRNA.

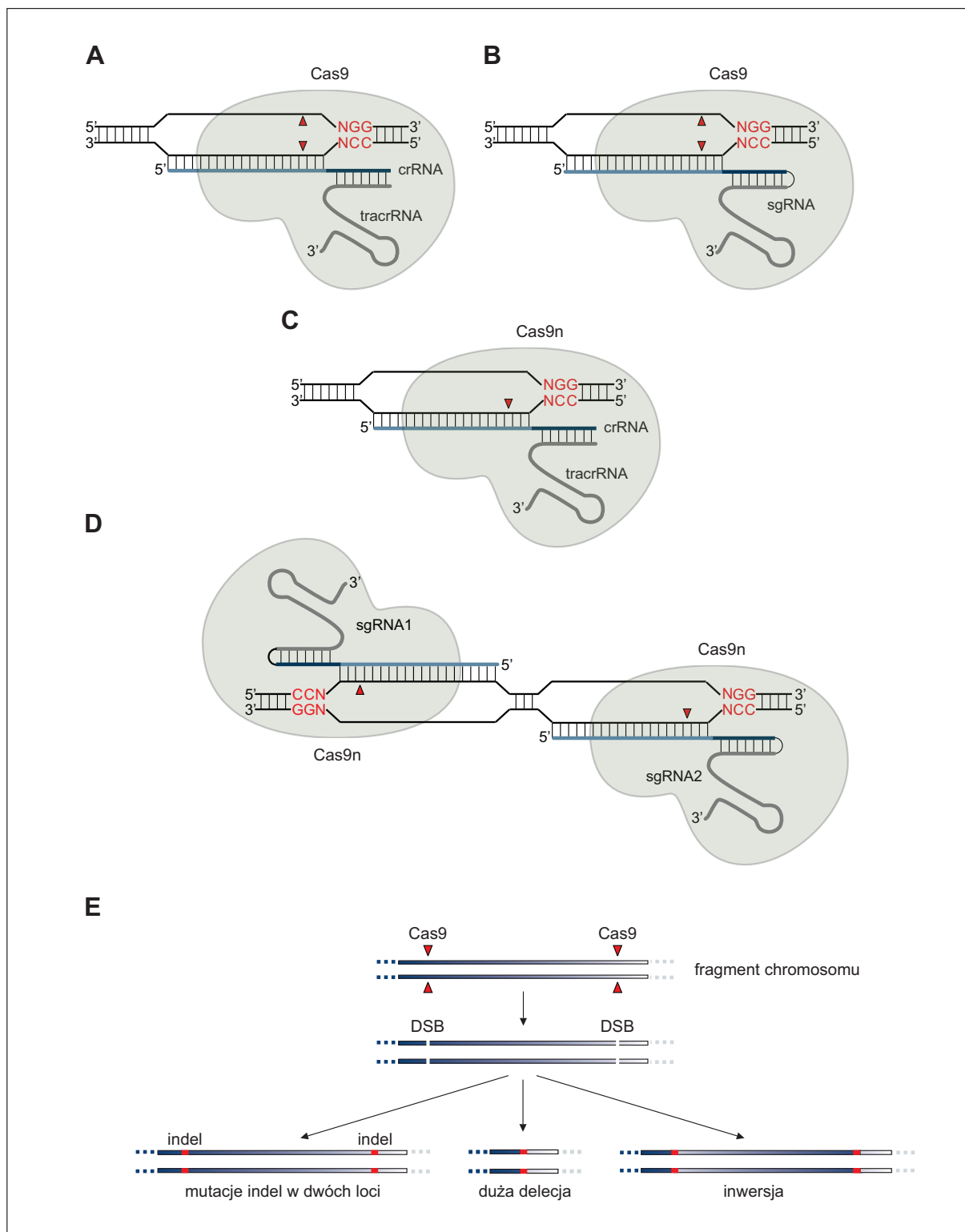
Wśród systemów CRISPR typu III wyróżnia się dwa podtypy: A i B, którym początkowo przypisywano różną swoistość. Częsteczkami docelowymi dla podtypu IIIA jest DNA i jak niedawno dowiedziano, także powstały na jego matrycy RNA [55,73]; *locus* CRISPR typu IIIB, przynajmniej *in vitro*, odpowiada za trawienie jednoniciowego RNA [30,96]. Podobnie jak w typie I, za obróbkę pre-crRNA odpowiadają endorybonukleazy z rodziny Cas6, jednak w odróżnieniu od typu I, crRNA podlega dodatkowemu cięciu przez nieznaną nukleazę, dzięki czemu powstaje heterogenna populacja dojrzałych crRNA, różniących się długością [31]. W przypadku obu podtypów niszczenie obcych elementów genetycznych wymaga obecności wielopodjednostkowego kompleksu, w skład którego wchodzi Cas10. Dla typu IIIA kompleks ten nazwano Csm, dla typu IIIB – Cmr [52]. W podtypie IIIA trawienie DNA i RNA przez Csm odbywa się niezależnie, angażując inne miejsca aktywne w obrębie kompleksu Csm. Białko Cas10, unikalne dla CRISPR-Cas typu III, odpowiada tu za aktywność nukleolityczną względem DNA; hydroliza RNA wymaga natomiast aktywności innego białka kompleksu, Csn3 [73]. Nie udało się jeszcze zidentyfikować sekwencji PAM dla typu III *loci* CRISPR i przypuszcza się, że nie wymagają one tego typu motywów. Wiadomo jednak, że cięcie obcego DNA *in vivo* przez Csm wymaga braku homologii między 5' końcem

crRNA (tzw. „crRNA tag”, zawierający 8-nukleotydowy motyw pochodzący z powtórzenia prostego) a obszarem sąsiadującym z końcem 5' targetowanego DNA [56,73]. Ten wymóg braku homologii uważany jest za mechanizm ochrony bakterii przed niszczeniem własnego DNA przez system CRISPR-Cas typu III. W genomie bakterii obszar sąsiadujący z sekwencją protospacer taką homologię oczywiście wykazuje. Występowanie homologii hamuje proces trawienia DNA, nie wpływa natomiast na hydrolizę RNA [73].

System CRISPR typu II różni się zasadniczo od typów I i III. Nie występuje tu ani swoista endonukleaza odpowiedzialna tylko za obróbkę pre-crRNA, ani wielobiałkowy kompleks odpowiedzialny za degradację obcych DNA lub RNA. Charakterystyczna dla tego systemu jest natomiast cząsteczka niewielkiego RNA nazwana tracrRNA. *Locus* CRISPR typu II zawiera zazwyczaj trzy lub cztery geny *cas*, wśród których obecny jest *cas9* (ryc. 4). Cas9 (znane również pod nazwą Csn1) to duże, wielodomenowe białko zawierające dwie domeny nukleazowe: domenę HNH oraz RuvC. Każda z tych domen odpowiada za trawienie jednej nici obcego DNA [34]. Oprócz *cas9*, w *locus* CRISPR typu II (tak jak w typach I i III) występują geny *cas1* i *cas2*. Zgodnie z obecnie przyjętą klasyfikacją, wśród *loci* typu II wyróżnić można trzy podtypy: A, B oraz C. Przynależność do jednego z podtypów jest zależna od obecności innych genów *cas* w danym *locus*. I tak dla podtypu IIA charakterystyczny jest gen *csn2*, którego produkt, białko Csn2, bierze udział w integracji nowych sekwencji rozdzielających [2]. Podtyp IIB charakteryzuje się obecnością genu *cas4*. Cas4 ma (przynajmniej *in vitro*) aktywność egzonukleazy działającej na jednoniciowy DNA [41,95], jednak dokładna rola tego białka w systemie CRISPR-Cas nie została jeszcze wyjaśniona. *Loci* składające się tylko z minimalnego zestawu genów *cas* (*cas9*, *cas1* i *cas2*) zostały sklasyfikowane jako podtyp IIC. Dla wszystkich trzech podtypów kluczowa dla obróbki pre-crRNA jest cząsteczka tracrRNA: niekodującego RNA, o sekwencji częściowo komplementarnej do RNA powstającego na matrycy powtórzeń prostych. W przeciwieństwie do typu I i III, typ II nie ma swoistej endorybonukleazy poświęconej hydrolizie pre-crRNA. Dwuniciowy RNA, złożony z pre-crRNA i tracrRNA, jest substratem dla bakteryjnej RNazy III; hydroliza wiązań w obrębie obu nici RNA następuje tylko w obecności



Ryc. 4. Organizacja *locus* CRISPR typu IIA *Streptococcus pyogenes*; czarne strzałki wskazują miejsce startu i kierunek transkrypcji tracrRNA i pre-crRNA



Ryc. 5. Edycja genomu z użyciem programowanych nukleaz opartych na naturalnie występujących (A) oraz zmodyfikowanych (B-D) systemach CRISPR-Cas. (A) Za rozpoznawanie docelowego DNA odpowiedzialna jest cząsteczka crRNA, tworząca dupleks z tracrRNA. Taki dupleks jest rozpoznawany przez Cas9; hydroliza zachodzi w obu niciach DNA. (B i C) Za rozpoznawanie docelowego DNA odpowiedzialna jest cząsteczka sgRNA, będąca połączeniem crRNA z tracrRNA. Wykorzystanie nukleazy Cas9 prowadzi do powstania pęknięcia w obu niciach DNA (B), natomiast zastosowanie nikazy Cas9n skutkuje pojawieniem się pęknięcia tylko w jednej nici (C). Wykorzystanie dwóch sgRNA, targetujących sąsiadujące *loci* indukuje powstanie pęknięć obu nici DNA (D). Pęknięcia takie mogą być naprawiane w procesie NHEJ. (E) Możliwe rezultaty zastosowania CRISPR-Cas targetujących dwa *loci* leżące na tym samym chromosomie. Jednoczesne powstanie dwóch DSB na jednym chromosomie może prowadzić do pojawienia się mutacji typu indel w obu targetowanych *loci* lub do delecji bądź inwersji fragmentu leżącego między targetowanymi *loci*

Cas9 [20]. Dojrzałe cząsteczki crRNA pozostają związane z tracrRNA i w kompleksie z nukleazą Cas9, uczestnicząc w rozpoznawaniu i degradacji przez Cas9 obcych DNA. Motyw PAM występuje na końcu 3' sekwencji tej nici DNA sekwencji protospacer, która jest (znaczeniowo) identyczna z crRNA.

EDYCJA GENOMU Z WYKORZYSTANIEM CRISPR-CAS9

Pierwszym krokiem do wprowadzenia modyfikacji w konkretnym miejscu w genomie jest wyindukowanie powstania DSB w tym rejonie. Dwuniciowe pęknięcia są naprawiane przeważnie przez niehomologiczne łączenie końców, w wyniku czego może dojść do zmiany pierwotnej sekwencji nukleotydów w DNA lub do powstania mutacji typu indel (insercja/delecja). Jeżeli mutacje typu indel pojawiają się w sekwencji kodującej białko, mogą doprowadzić do przesunięcia ramki odczytu genu i pojawienia się przedwczesnych kodonów STOP (PSC, premature stop codon), kończących translację. Choć transkrypcja może przebiegać bez zakłóceń, to nie powstaje funkcjonalne białko. Na ogół nie powstaje też skrócony (do miejsca występowania PSC) peptyd, ponieważ w komórce kodujące go mRNA są usuwane w procesie degradacji transkryptów niosących przedwczesny kodon stop. Poza NHEJ, do naprawy DSB może dojść w procesie rekombinacji homologicznej. Mechanizm ten może być wykorzystany do wprowadzenia ściśle określonych zmian w danym *locus*: mutacji punktowych, insercji (np. wprowadzenie metki do sekwencji kodującej białko czy zastąpienie segmentu DNA fragmentem kodującym gen markerowy) czy ściśle zdefiniowanych delecji (np. usunięcie sekwencji kodującej fragment białka).

Działanie naturalnych systemów CRISPR-Cas typu II w bakteriach różni się nieco od działania systemu stosowanego do edycji genomu. W systemach będących narzędziem do precyzyjnej modyfikacji genomowego DNA komórek eukariotycznych nie ma etapu adaptacji; aby wprowadzić zmiany w pożądanym miejscu genomu niezbędne elementy systemu muszą być dostarczone komórce „z zewnątrz”. Ich ekspresja jest zazwyczaj przejściowa, ale powoduje wprowadzenie stałych zmian w genomie. Targetowany DNA można uznać za odpowiednik sekwencji protospacer.

Pierwsze doniesienia o mutacjach wprowadzonych do genomu komórek ssaczych z wykorzystaniem systemu CRISPR-Cas9 pojawiły się na początku 2013 r. [16,54]. System CRISPR-Cas został z sukcesem wykorzystany do modyfikacji genomu zarówno ludzkich jak i zwierzęcych linii komórkowych, jak i całych organizmów: roślin (m. in. rzodkiewnika pospolitego, tytoniu czy ryżu) i zwierząt: myszy, szczurów, królików, makaków jawańskich, nicienia *Caenorhabditis elegans*, danio pręgowanego, muszki owocowej, jedwabnika morwowego, a także zwierząt o znaczeniu gospodarczym: świń, kóz i bydła [48,62,64,77,90]. W inżynierii genomowej zastosowanie znalazły narzędzia oparte na CRISPR typu II. W przeciwieństwie do typów I i III, których poprawne funkcyj-

nowanie wymaga wielopodjednostkowych kompleksów białkowych, działanie typu II opiera się na pojedynczej nukleazie, Cas9. Cong i wsp. udowodnili, że jedynymi komponentami wymaganymi do precyzyjnego cięcia DNA w komórkach eukariotycznych są crRNA, tracrRNA oraz Cas9 [16]. Dojrzewanie prekursorowego crRNA zachodzi bez udziału bakteryjnej RNazy III, prawdopodobnie zastępowanej przez jeszcze niezidentyfikowaną eukariotyczną nukleazę. System może być uproszczony przez zastosowanie chimerycznego RNA (określanego mianem single-guide RNA, sgRNA lub guide RNA, gRNA), stanowiącego połączenie crRNA z tracrRNA [16,34,54] (ryc. 5). Początkowe eksperymenty wskazywały na większą wydajność wprowadzania mutacji za pomocą Cas9 (pochodzącej ze *S. pyogenes*, dalej określanej jako SpCas9), crRNA i tracrRNA w porównaniu do SpCas9 wraz z sgRNA [16]. W eksperymentach wykorzystano architekturę sgRNA(+48), zawierającą jedynie 48 nukleotydów pochodzących z tracrRNA. Wydłużenie sekwencji tracrRNA na końcu 3' w kolejnych zmodyfikowanych architekturach – sgRNA(+67) i sgRNA(+85) – znacząco poprawiło wydajność wprowadzania mutacji systemu opartego na sgRNA [33].

Wybór targetowanej sekwencji

Aby wyindukować powstanie DSB w wybranym miejscu w genomie z wykorzystaniem narzędzi opartych o CRISPR-Cas pochodzący z bakterii *S. pyogenes*, trzeba wprowadzić do komórki, której genom jest modyfikowany, enzym Cas9 oraz sgRNA. Wykorzystuje się w tym celu plazmid kodujący oba elementy lub RNA po transkrypcji *in vitro*. Część sgRNA, odpowiadająca za rozpoznawanie docelowego DNA stanowi dwadzieścia nukleotydów na jego końcu 5'. Ten fragment sgRNA jest więc komplementarny do jednej, a tym samym tożsamy z drugą nicią targetowanej sekwencji DNA.

Hydroliza DNA przez Cas9 wymaga obecności motywu PAM ulokowanego bezpośrednio za targetowaną sekwencją (sekwencją targetowaną określamy nić DNA identyczną z sgRNA). Sekwencje PAM rozpoznawane przez różne ortologi Cas9 różnią się znacząco między sobą. Na przykład dla systemu wykorzystującego nukleazę Cas9 ze *Streptococcus pyogenes* najbardziej wydajne cięcie zachodzi wtedy, gdy targetowany obszar sąsiaduje z motywem 5'-NGG [34,57]. Cięcie może zachodzić również z niewielką wydajnością w obecności innych, niekanonicznych sekwencji PAM, np. 5'-NAG [33] czy 5'-NGA [97]. Cas9 pochodzące z innych organizmów wymagają odmiennych motywów PAM, np. *S. thermophilus* szczepu DGCC7710 potrzebuje sekwencji 5'-NNAGAAW (CRISPR1; W oznacza A lub T) lub 5'-NGGNG (CRISPR3) [21,36], a Cas9 z *Neisseria meningitidis* – 5'-NNNNGATT [32]. Mutanty SpCas9 mogą rozpoznawać inne sekwencje PAM niż SpCas9 typu dzikiego (5'-NGAN, 5'-NGNG i 5'-NGCG odpowiednio w mutantach D1135V/R1335Q/T1337R, D1135E/R1335Q/T1337R i D1135V/G1218R/R1335E/T1337R) [38], co znacząco zwiększa liczbę możliwości do modyfikacji miejsc w genomie.

Do syntezy sgRNA w komórkach eukariotycznych wykorzystuje się endogenną polimerazę RNA III, umieszczając transgen pod kontrolą odpowiedniego promotora, często promotora U6. Wydajna transkrypcja z tego promotora wymaga obecności guanylanu na końcu 5' targetowanej sekwencji. Ograniczenie to można pominąć przez dodanie jednej lub dwóch, niewystępujących w targetowanej sekwencji, nukleotydów guaninowych na końcu 5' sgRNA [14,15]. W przeciwieństwie do ZFN i TALEN, nukleaza Cas9 jest zdolna do cięcia metylowanego DNA [33].

Jednoczesne cięcie wielu *loci*

Natura systemu CRISPR-Cas umożliwia jednoczesną transkrypcję wielu pre-crRNA, a co za tym idzie – targetowanie wielu *loci* jednocześnie. W tym celu wystarczy między sekwencje pre-crRNA dodać sekwencję powtórzenia prostego. Cong i wsp. wykorzystali taką strategię do wprowadzenia mutacji w DNA komórek HEK293 jednocześnie w *loci* *EMX1* i *PVALB* [16]. Zamiast pary crRNA-tracrRNA można wykorzystać sgRNA: albo przez jednoczesną transfekcję plazmidami kodującymi różne sgRNA, albo konstruując wektor kodujący kilka sgRNA jednocześnie (ekspresja każdego sgRNA znajduje się wówczas pod kontrolą osobnego promotora). Multipleksowość stwarza możliwość nie tylko jednoczesnego targetowania kilku *loci* [16,44,48,62,90], ale także wprowadzania dużych delecji (sięgających nawet milionów par zasad) [22,44,88], inwersji [5,44,50,88] czy translokacji [40,50] (ryc. 5).

Cięcie niepożądanych *loci*

CRISPR-Cas jest jedynym narzędziem inżynierii genomowej, w którym swoistość rozpoznawanej sekwencji opiera się na parowaniu zasad DNA-RNA zgodnie z modelem Watsona-Cricka, a nie jak w przypadku ZFN czy TALEN na oddziaływaniach białko-DNA. Chociaż ekspresja komponentów systemu w komórkach ssaczych nie wiąże się z widocznymi objawami cytotoxycywności [54], przy wykorzystaniu systemu CRISPR-Cas także może dochodzić do indukowania mutacji w niepożądanych *loci* [18,23,33]. Według Fu i wsp., tolerowana jest niezgodność nawet do pięciu par zasad między crRNA i komplementarnym do niego odcinkiem DNA [23]. Badania z użyciem nieaktywnej katalitycznie Cas9 (dCas9) wykazały, że białko to może się wiązać do regionów, w których niedopasowanie sgRNA i DNA wynosi nawet dziewięć nukleotydów [39]. Mimo to, w eksperymentach z wykorzystaniem aktywnej nukleazy Cas9 dla większości przetestowanych sekwencji sgRNA nie wykryto mutacji w innych niż w pełni komplementarne *loci*. Warto zaznaczyć, że sekwencje off-target, do których preferencyjnie wiązała się dCas9, były miejscami podatnymi na trawienie DNazą I (takie jak np. promotory genów, regiony 5' UTR oraz eksony). Sugeruje to, że struktura chromatyny ma bardzo duży wpływ na zdolność wiązania dCas9 [39]. Cięcie sekwencji off-target zachodzi z większą wydajnością przy wysokich stężeniach Cas9-sgRNA [33,63,83].

Według ostatnich doniesień, nukleaza Cas9 jest zdolna do cięcia sekwencji DNA nie w pełni zgodnych z crRNA (lub z fragmentem odpowiadającym crRNA w obrębie sgRNA) nie tylko w przypadku występowania niekomplementarnych par nukleotydów, ale także wtedy, gdy między crRNA i DNA występują niewielkie, 1-4-nukleotydowe insercje lub delecje [43]. Przekłada się to na występowanie niewielkich wypętleń w obrębie crRNA, gdy w genomowym DNA występuje delecja lub wypętleń DNA, gdy targetowany DNA jest dłuższy niż komplementarny crRNA. Zdolność Cas9 do hydrolizy wiązań fosfodiesterowych w DNA zależy w tym przypadku także od umiejscowienia wypętleń. Wang i wsp., wykorzystując zdolność włączania się nieintegrujących wektorów lentiwirusowych do DNA w miejscu występowania DSB, wykazali, że CRISPR-Cas może indukować powstawanie pęknięć DNA w miejscach o większej, sięgającej nawet 13, liczbie niekomplementarnych nukleotydów [83]. Jednak gdy uwzględnia się możliwość tworzenia wypętleń, w tym przypadku przez crRNA, liczba niekomplementarnych par nukleotydów zmniejszy się do jednej.

Początkowo w badaniach swoistości systemu CRISPR-Cas9 sugerowano istnienie tzw. sekwencji rdzeniowej (seed sequence) w crRNA, obejmującej około 12 nukleotydów bliższych sekwencji PAM. Wszelkie niedopasowania w jej obrębie miały być mniej tolerowane, niż niezgodności w fragmencie bardziej oddalonym od PAM [16,34]. Późniejsze badania dowiodły, że swoistość systemu zależy nie tylko od liczby oraz pozycji, ale także rozkładu niekomplementarnych par nukleotydów [23,33].

Aby zmniejszyć prawdopodobieństwo cięcia niepożądanych sekwencji, można wykorzystać wersję Cas9 z mutacją punktową znoszącą aktywność jednej z domen nukleazowych (D10A w obrębie domeny RuvC lub H840A w domenie HNH) [70], a więc powodującą, że enzym przecina tylko jedną nici DNA (ryc. 5). Cas9 z unieczynnioną jedną z domen nukleazowych jest określana jako nikaza (Cas9n). Aby uzyskać wówczas inaktywację wybranego genu można wykorzystać zjawisko naprawy przez rekombinację homologiczną, używając nici donorowej, służącej jako matryca w procesie rekombinacji, z wersją genu zawierającą kodon stop. Innym sposobem jest użycie dwóch sgRNA, targetujących sąsiadujące miejsca w obu niciach [70] (ryc. 5). Każde sgRNA będzie indukował hydrolizę wiązania fosfodiesterowego w obrębie tylko jednej nici DNA; zastosowanie dwóch sgRNA doprowadzi do powstania pęknięcia obu nici DNA w niewielkiej odległości od siebie. Pęknięcia takie są naprawiane w procesie niehomologicznego łączenia końców, prowadząc do pojawienia się mutacji typu indel. Metoda taka gwarantuje zdecydowanie większą swoistość, gdyż prawdopodobieństwo występowania blisko siebie w genomie dwóch sekwencji rozpoznawanych przez odrębne sgRNA jest znikome, a jednoniciowe pęknięcia w miejscach off-target w znakomitej większości są naprawiane przez wycięcie zasady (BER, base excision repair) – mechanizm nieindukujący mutacji. Takie podejście pozwoliło zmniejszyć częstotliwość cięcia niepożądanych *loci* od 50

do nawet 1500 razy w stosunku do Cas9 typu dzikiego [70], jednak nie wyeliminowała ich zupełnie. System wykorzystujący dwa sgRNA i Cas9n(D10A) do mutacji niektórych *loci* nadal może indukować powstawanie niepożądanych mutacji w innych miejscach genomu [29,80]. Częstotliwość niechcianych zmian w genomie można także zredukować, wykorzystując wersję fuzyjną białka dCas9 z domeną nukleazową FokI (fCas9). FokI może działać tylko jako dimer, co kilkakrotnie podnosi swoistość systemu w stosunku do Cas9n kierowanych dwoma sgRNA [29,80]. Ogranicza to jednak liczbę miejsc w genomie podatnych na modyfikację, ponieważ fCas9 wymaga obecności dwóch sekwencji PAM w odpowiedniej odległości i orientacji, przy czym zakres tolerowanych odległości jest znacznie mniejszy niż w przypadku Cas9n. Istnieje zatem pula genów, dla których nie da się zaprojektować sgRNA współdziałających z fCas9.

Innym sposobem obniżenia aktywności off-target jest zastosowanie sgRNA z częścią komplementarną do targetowanego miejsca skróconą do 17-18 nukleotydów [24]. Takie sgRNA może wykazywać nawet kilkusetprocentowy spadek aktywności off-target, nie wpływając na wydajność cięcia w targetowanym *locus* [24]. Skrócone sgRNA mogą być także wykorzystane z Cas9n, dodatkowo obniżając częstość wprowadzania mutacji w niepożądanych *loci* [87].

WYKORZYSTANIE EDYCJI GENOMU W BADANIACH NAUKOWYCH, MEDYCYNIE I BIOTECHNOLOGII

CRISPR-Cas stwarza niezwykle możliwości edycji genomu, nieograniczające się jedynie do tworzenia linii komórkowych czy zwierząt typu knock-out. Niżej przedstawiono kilka ciekawych możliwości wykorzystania systemu CRISPR-Cas.

Tworzenie zwierzęcych i komórkowych modeli chorób

Wykorzystanie systemu CRISPR-Cas umożliwia znacznie bardziej wydajne, tańsze i szybsze uzyskiwanie transgeniczných zwierząt w stosunku do metod tradycyjnych, opartych tylko na zjawisku rekombinacji homologicznej. Aby wprowadzić zmianę w określonym miejscu genomu metodą klasyczną niezbędne jest użycie ESC, które są później wszczepiane do blastocysty. Chimeryczne potomstwo musi być krzyżowane ze zwierzętami typu dzikiego, aby wyodrębnić osobniki, w których pożądana modyfikacja występuje w komórkach rozrodczych. Takie osobniki trzeba po raz kolejny krzyżować, tym razem między sobą, aby wyodrębnić zwierzęta z modyfikacjami w obu allelach. Edycja genomu wykorzystująca system CRISPR-Cas omija ten problem, gdyż zamiast ESC wykorzystuje zapłodnione komórki jajowe, a dzięki temu otrzymanie zwierząt z biallelicznymi modyfikacjami możliwe jest już w pierwszym pokoleniu. Ponadto, CRISPR-Cas pozwala na tworzenie transgeniczných zwierząt, których otrzymanie klasycznymi metodami było kłopotliwe lub nawet niemożliwe z powodu m.in. trudności z izolacją funkcjonalnych ESC, stanowiących pod-

stawę klasycznej transgenezy [76]. Stosując CRISPR-Cas przełamano tę barierę i uzyskano chimeryczne króliki i naczelné [76,84].

Dzięki systemowi CRISPR-Cas można tworzyć zwierzęce modele chorób genetycznych. Mutacje wprowadzane do genomu zwierzęcia mogą odzwierciedlać mutacje znajdowane u osób cierpiących na poszczególne choroby. Możliwość edycji wielu *loci* jednocześnie pozwala na tworzenie zwierzęcych modeli chorób wielogenowych.

Aby zmodyfikować dany *locus*, do komórki jajowej zapłodnionej *in vitro*, za pomocą mikromanipulatora wprowadza się zazwyczaj transkrypty Cas9 i sgRNA. Stosuje się na ogół „gotowy” RNA a nie plazmid kodujący Cas9 i sgRNA, gdyż wydajność modyfikacji danego *locus* jest wówczas większa. Taka strategia umożliwiła generację wielu gatunków transgeniczných zwierząt, m.in. myszy, szczurów, królików czy nawet makaka jawańskiego [49,62,90,93]. Wiele genów jest jednak niezbędnych do prawidłowego rozwoju zwierząt w życiu płodowym i ich inaktywacja prowadzi do śmierci. Pomocne w takich sytuacjach są mutanty warunkowe, w których inaktywacja danego genu zachodzi tylko w niektórych tkankach. Do niedawna większość zwierząt z mutacjami warunkowymi stworzona była w oparciu o rekombinację homologiczną. Wzbogacenie tej techniki o system CRISPR-Cas znacząco podniosło jej efektywność. W literaturze można odnaleźć liczne przykłady zastosowania techniki CRISPR-Cas do wyprowadzania mutantów warunkowych myszy, szczurów, muszek owocowych czy danio przegonnych [27,49,91,93].

Wykorzystanie systemu CRISPR-Cas dostarczanego do komórek przez wektory wirusowe umożliwiło wprowadzenie mutacji w komórkach dorosłych zwierząt *in vivo*. Po wprowadzeniu wektorów adenowirusowych lub lentiwirusowych targetujących geny *Alk* i *Eml4* do płuc myszy w części komórek dochodziło do inwersji fragmentu między targetowanymi sekwencjami i tworzenia onkogenego białka fuzyjnego *Eml4-Alk* [5,50]. Ekspresja takiego białka fuzyjnego prowadziła do rozwoju nowotworów płuc u badanych zwierząt. Analogiczne mutacje znajduje się w niektórych przypadkach ludzkiego niedrobnokomórkowego nowotworu płuc. Stworzono więc znakomity model zwierzęcy choroby o konkretnym podłożu genetycznym. Jednak wykorzystanie wektorów lentiwirusowych niesie za sobą ryzyko mutagenyzy inwersyjnej, wektory adenowirusowe są natomiast immunogenne. Rozwiązaniem tych problemów mogło być wykorzystanie, jako wektorów, wirusów związanych z adenowirusami (AAV, adeno-associated viruses), ale użycie ich do dostarczenia elementów CRISPR-Cas do komórek dorosłych osobników wymagało przezwyciężenia dodatkowej przeszkody, związanej z ich ograniczoną pojemnością. Wielkość powszechnie stosowanej nukleazy Cas9 z *S. pyogenes* uniemożliwiała wykorzystanie pojedynczego wektora AAV. Stało się to możliwe dzięki wykorzystaniu ortologa Cas9 z bakterii *Staphylococcus aureus*, charakteryzującego się znacznie mniejszym rozmiarem [69].

Wizualizacja swoistych miejsc w genomie żywych komórek

Tradycyjne techniki umożliwiające wizualizację swoistych miejsc w genomie, jak FISH (fluorescence *in situ* hybridization), wymagają utrwalenia komórek i denaturacji DNA [67], co wyklucza badanie stanu chromatyny podczas procesów zachodzących w żywych komórkach. Dzięki zastosowaniu nieaktywnej katalitycznie Cas9 (dCas9) połączonej z białkiem fluorescencyjnym i współdziałającej z odpowiednio zaprojektowanymi sgRNA, możliwa stała się wizualizacja konkretnych, interesujących badacza, miejsc w genomie żywych komórek [1,12]. Takie podejście pozwoliło np. na obserwację dynamiki i organizacji chromatyny podczas różnych procesów komórkowych czy na lokalizację poszczególnych *loci* w jądrze komórkowym. Do wizualizacji sekwencji repetytywnych (np. telomerów) wystarcza jeden sgRNA [12]; wizualizacja sekwencji nierepetytywnych np. genu kodującego jakieś białko wymaga zastosowania wielu sgRNA (ich liczba waha się między 26 a 36) zawierających sekwencje komplementarne do różnych fragmentów genu [12]. Wykorzystując różnorodne ortologi dCas9 połączone z białkami fluorescencyjnymi odmiennych kolorów, możliwe jest jednoczesne znakowanie kilku *loci* [47], a przez to np. wyznaczenie rzeczywistych odległości między interesującymi *loci*. Metoda ta może się stać niezwykle pomocna przy badaniu architektury jądra komórkowego lub stopnia kondensacji chromatyny w danym obszarze chromosomu.

Aktywacja bądź wyciszenie ekspresji wybranych genów

Nieaktywna katalitycznie wersja Cas9, dCas9, przy jednoczesnej ekspresji sgRNA lub crRNA komplementarnej do nici matrycowej DNA, może być wykorzystana do hamowania transkrypcji wybranych genów. System działa wydajnie w komórkach bakterii [3,68], hamując inicjację lub elongację, zależnie od położenia docelowej sekwencji względem miejsca startu transkrypcji [3]. W komórkach eukariotycznych osiąga się jedynie umiarkowane zahamowanie transkrypcji i to nie we wszystkich badanych *loci* [68]. Wydajność represji transkrypcji można znacznie zwiększyć przez fuzję dCas9 z domeną represorową, np. domeną KRAB [26,37,68]. Wyciszenie ekspresji genów wykorzystujące system CRISPR zostało nazwane CRISPRi (CRISPR interference) [68]. CRISPRi może być alternatywą dla wyciszenia ekspresji genów za pomocą interferującego RNA. CRISPRi działa na poziomie DNA, a nie RNA (jak interferujący RNA), dzięki czemu można osiągnąć znaczne wyciszenie ekspresji interesującego genu targetując obszar promotorowy genu, a nie tylko sekwencję kodującą [26].

dCas9 może być także przekształcona w aktywator transkrypcji przez dołączenie domeny transaktywującej, jak VP16 (w trzech lub czterech kopiach, nazywanych odpowiednio VP48 i VP64) czy domenę aktywującą z białka p65 [26,37,51,53,65]. Aby osiągnąć wydajną aktywację transkrypcji wybranego genu, trzeba dostarczyć kilka

różnych sgRNA, zwykle 2-10. Takie jednoczesne wprowadzenie kilku sgRNA ma działanie synergistyczne – skutkuje większą indukcją ekspresji niż wynikałoby to z sumy efektów pojedynczych sgRNA [51,65].

Spersonalizowana medycyna

Zastosowanie systemu CRISPR-Cas wpływa zasadniczo na poprawę wydajności naprawy przez rekombinację homologiczną [54]. Skuteczne wprowadzenie obcego DNA w wybrane miejsce w genomie pozwala m.in. zamienić zmutowany gen na jego poprawną wersję. Zjawisko to mogłoby być w przyszłości wykorzystane w leczeniu chorób jednogennych, jak na przykład dystrofia mięśniowa Duchenne’a czy mukowiscydoza.

Aby zmienić gen na jego poprawną wersję wykorzystując mechanizm naprawy przez rekombinację homologiczną, oprócz elementów systemu CRISPR-Cas (sgRNA i Cas9) trzeba jednocześnie wprowadzić do komórki matrycę zawierającą poprawną wersję genu. Taka matryca musi być oflankowana sekwencjami homologicznymi do targetowanego miejsca – są to tzw. ramiona homologii. Jako matrycę donorową wykorzystuje się zwykle plazmidowy DNA (ramiona homologii są zazwyczaj długości 500-1000 par zasad każde) lub krótkie fragmenty jednoniciowego DNA (ssDNA; jego długość wynosi zwykle 40-100 nukleotydów). Wydajność rekombinacji wykorzystującej ssDNA jako matrycę donorową, mimo znacznie zredukowanej długości ramion homologii, może być większa w stosunku do wydajności osiągananej z użyciem plazmidowego DNA [13].

Badania tego rodzaju przeprowadzono już na zwierzętach. Long i wsp. naprawili gen dystrofiny w embriochonach myszy *mdx* noszących mutację nonsensowną w eksonie 23 genu *Dmd* [46]. Co ciekawe, w wyniku działania CRISPR-Cas do naprawy mutacji nonsensownej doszło w 2-100% alleli. Naprawa mutacji w zaledwie 17% alleli okazała się wystarczająca do tego, aby ekspresja dystrofiny we włóknach mięśniowych była na podobnym poziomie, jak u myszy typu dzikiego. Wśród myszy, w których został skorygowany gen dystrofiny zidentyfikowano zwierzęta, w których zaszła rekombinacja z udziałem matrycy donorowej, jak również takie, w których kodon stop został usunięty w procesie NHEJ. Stosując wektory AAV udało się częściowo przywrócić ekspresję funkcjonalnej dystrofiny w miocytach i kardiomiocytach myszy w okresie życia płodowego, po urodzeniu, a także u dorosłych zwierząt [45,61].

U ludzi, mutacje w obrębie genu kodującego dystrofinę wywołujące dystrofię mięśniową Duchenne’a (DMD) to często duże zmiany, takie jak utrata lub duplikacja jednego lub kilku eksonów. Jednak najczęściej bezpośrednią przyczyną choroby nie jest brak jakiejś domeny białka, lecz całkowity lub prawie całkowity brak dystrofiny spowodowany zmianą ramki odczytu i pojawieniem się przedwczesnego kodonu stop skutkującym degradacją mRNA. Edycja genomu polegająca na wpro-

wadzeniu zmian przywracających prawidłową ramkę odczytu (przez usunięcie fragmentu genu lub naprawę przez rekombinację czy też zmiany typu indel) mogłyby doprowadzić do pojawienia się aktywnej dystrofiny [42]. Analiza znanych mutacji w genie dystrofiny u pacjentów pozwoliła na przedstawienie opinii, że aż 80% chorych miałyby szansę na częściowe przywrócenie funkcjonalnego białka dzięki edycji genomu (np. z wykorzystaniem CRISPR-Cas) [45,61]. Potwierdzeniem takiej możliwości było uzyskanie ekspresji dystrofiny w indukowanych komórkach pluripotencjalnych (iPSCs) wyprowadzonych z fibroblastów pacjenta z dystrofią wywołaną brakiem 44 eksonu [42]. Wyniki badań wskazują, że długotrwały efekt terapeutyczny można byłoby uzyskać wprowadzając zmiany w genomie komórek satelitowych mięśni [75].

Inna grupa wykazała możliwość naprawy mutacji w genie *HBB*, kodującym hemoglobinę beta, w iPSCs wyprowadzonych z fibroblastów osób cierpiących na beta-talasemię [89]. Komórki, w których doszło do naprawy genu *HBB*, po zróżnicowaniu do erytroblastów odzyskiwały ekspresję hemoglobiny beta. Komórki iPSCs wyprowadzane z komórek pacjentów cierpiących na choroby genetyczne, po naprawie wadliwych genów z wykorzystaniem programowanych nukleaz mogą w przyszłości stanowić źródło komórek do autoprzeszczepów.

Yin i wsp. przedstawili możliwość naprawy zmutowanego genu u dorosłych osobników – udało im się zmienić zmutowany gen hydroksylazy fumarylooctanowej (Fah) w hepatocytach myszy *Fah5981SB* [92]. Zwierzęta te stanowią model dziedzicznej tyrozynemii typu I. Wektor kodujący sgRNA i SpCas9 oraz matrycę do rekombinacji – jednoniciowy DNA – dostarczono do wątroby przez

iniekcję hydrodynamiczną do żyły ogonowej. Początkowa częstość naprawy genu *Fah* wyniosła około 0,4%. Gdy zaprzestano podawania takim zwierzętom inhibitora szlaku rozkładu tyrozyny dochodziło do ekspansji hepatocytów *Fah*⁺ – po 30 dniach od ostawienia inhibitora hepatocyty *Fah*⁺ stanowiły już ponad 30% wszystkich hepatocytów. Naprawa zmutowanego genu przez jego zamianę na postać prawidłową ma znaczną przewagę nad klasyczną strategią polegającą na dostarczeniu do komórek dodatkowych, prawidłowych kopii genu – skorygowany gen będzie funkcjonował w swoim naturalnym otoczeniu, co pozwoli ominąć np. problem nie naturalnego poziomu ekspresji transgenów.

Wykorzystanie systemu CRISPR-Cas nie ogranicza się jedynie do naprawy mutacji leżących u podstaw chorób genetycznych. CRISPR-Cas niedawno z sukcesem wykorzystano do inaktywacji genu *CCR5* w ludzkich komórkach CD4⁺ [82]. *CCR5* jest celem wielu terapii skierowanych przeciwko wirusowi HIV, gdyż receptor ten jest wykorzystywany przez wirusa do zakażenia limfocytów T. W ostatnich latach publikowano doniesienia o skutecznej inaktywacji *CCR5* z wykorzystaniem nukleazy ZFN i TALEN [60,66]. Pierwsze testy kliniczne z wykorzystaniem ZFN do inaktywacji genu *CCR5* w komórkach krwi pobranych od pacjentów zarażonych wirusem HIV wykazały skuteczność terapii: po transfuzji zmutowanych komórek poziom RNA wirusa zmniejszył się (u jednego z czterech pacjentów, którzy ukończyli próbę kliniczną, poziom spadł poniżej progu detekcji) [78]. Wykorzystanie Cas9 zamiast ZFN czy TALEN może umożliwić bardziej wydajne wprowadzanie mutacji, a dodatkowo obniżyć koszty przedsięwzięcia.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Anton T., Bultmann S., Leonhardt H., Markaki Y.: Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system. *Nucleus*, 2014; 5: 163-172
- [2] Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P.: CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007; 315: 1709-1712
- [3] Bikard D., Jiang W., Samai P., Hochschild A., Zhang F., Marraffini L.A.: Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.*, 2013; 41: 7429-7437
- [4] Bitinaite J., Wah D.A., Aggarwal A.K., Schildkraut I.: FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 10570-10575
- [5] Blasco R.B., Karaca E., Ambrogio C., Cheong T.C., Karayol E., Minero V.G., Voena C., Chiarle R.: Simple and rapid in vivo generation of chromosomal rearrangements using CRISPR/Cas9 technology. *Cell Rep.*, 2014; 9: 1219-1227
- [6] Bogdanove A.J., Voytas D.F.: TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*, 2011; 333: 1843-1846
- [7] Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D.: Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005; 151: 2551-2561
- [8] Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Slijkhuys R.J., Snijders A.P., Dickman M.J., Makarova K.S., Koonin E.V., van der Oost J.: Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008; 321: 960-964
- [9] Bult C.J., White O., Olsen G.J., Zhou L., Fleischmann R.D., Sutton G.G., Blake J.A., FitzGerald L.M., Clayton R.A., Gocayne J.D., Kerlavage A.R., Dougherty B.A., Tomb J.F., Adams M.D., Reich C.I. i wsp.: Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 1996; 273: 1058-1073
- [10] Capecchi M.R.: Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989; 244: 1288-1292
- [11] Carte J., Wang R., Li H., Terns R.M., Terns M.P.: Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev.*, 2008; 22: 3489-3496
- [12] Chen B., Gilbert L.A., Cimini B.A., Schnitzbauer J., Zhang W., Li G.W., Park J., Blackburn E.H., Weissman J.S., Qi L.S., Huang B.: Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 2013; 155: 1479-1491
- [13] Chen F., Pruett-Miller S.M., Huang Y., Gjoka M., Duda K., Taunton

- J., Collingwood T.N., Frodin M., Davis G.D.: High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat. Methods*, 2011; 8: 753-755
- [14] Cho S.W., Kim S., Kim J.M., Kim J.S.: Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.*, 2013; 31: 230-232
- [15] Cho S.W., Kim S., Kim Y., Kweon J., Kim H.S., Bae S., Kim J.S.: Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.*, 2014; 24: 132-141
- [16] Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F.: Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013; 339: 819-823
- [17] Cornu T.I., Thibodeau-Beganny S., Guhl E., Alwin S., Eichinger M., Joung J.K., Cathomen T.: DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. *Mol. Ther.*, 2008; 16: 352-358
- [18] Cradick T.J., Fine E.J., Antico C.J., Bao G.: CRISPR/Cas9 systems targeting β -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res.*, 2013; 41: 9584-9592
- [19] Datsenko K.A., Pougach K., Tikhonov A., Wanner B.L., Severinov K., Semenova E.: Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nat. Commun.*, 2012; 3: 945
- [20] Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E.: CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011; 471: 602-607
- [21] Deveau H., Barrangou R., Garneau J.E., Labonté J., Fremaux C., Boyaval P., Romero D.A., Horvath P., Moineau S.: Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.*, 2008; 190: 1390-1400
- [22] Essletz bichler P., Konopka T., Santoro F., Chen D., Gapp B.V., Kralovics R., Brummelkamp T.R., Nijman S.M., Bürckstümmer T.: Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res.*, 2014; 24: 2059-2065
- [23] Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D.: High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.*, 2013; 31: 822-826
- [24] Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K.: Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.*, 2014; 32: 279-284
- [25] Garneau J.E., Dupuis M.E., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadán A.H., Moineau S.: The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010; 468: 67-71
- [26] 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.: CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013; 154: 442-451
- [27] Gratz S.J., Ukken F.P., Rubinstein C.D., Thiede G., Donohue L.K., Cummings A.M., O'Connor-Giles K.M.: Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics*, 2014; 196: 961-971
- [28] Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C.: The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 2007; 8: 172
- [29] Guilinger J.P., Thompson D.B., Liu D.R.: Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat. Biotechnol.*, 2014; 32: 577-582
- [30] Hale C.R., Zhao P., Olson S., Duff M.O., Graveley B.R., Wells L., Terns R.M., Terns M.P.: RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 2009; 139: 945-956
- [31] Hatoum-Aslan A., Samai P., Maniv I., Jiang W., Marraffini L.A.: A ruler protein in a complex for antiviral defense determines the length of small interfering CRISPR RNAs. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 27888-27897
- [32] Hou Z., Zhang Y., Propson N.E., Howden S.E., Chu L.F., Sontheimer E.J., Thomson J.A.: Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: 15644-15649
- [33] Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F.: DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.*, 2013; 31: 827-832
- [34] Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E.: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012; 337: 816-821
- [35] Jurica M.S., Stoddard B.L.: Homing endonucleases: structure, function and evolution. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999; 55: 1304-1326
- [36] Karvelis T., Gasiunas G., Miksys A., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V.: crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biol.*, 2013; 10: 841-851
- [37] Kearns N.A., Genga R.M., Enuameh M.S., Garber M., Wolfe S.A., Maehr R.: Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells. *Development*, 2014; 141: 219-223
- [38] Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V.V., Nguyen N.T., Zheng Z., Gonzales A.P., Li Z., Peterson R.T., Yeh J.R., Aryee M.J., Joung J.K.: Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 2015; 523: 481-485
- [39] Kescu C., Arslan S., Singh R., Thorpe J., Adli M.: Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat. Biotechnol.*, 2014; 32: 677-683
- [40] Lagutina I.V., Valentine V., Picchione F., Harwood F., Valentine M.B., Villarejo-Balcells B., Carvajal J.J., Grosveld G.C.: Modeling of the human alveolar rhabdomyosarcoma Pax3-Foxo1 chromosome translocation in mouse myoblasts using CRISPR-Cas9 nuclease. *PLoS Genet.*, 2015; 11: e1004951
- [41] Lemak S., Nocek B., Beloglazova N., Skarina T., Flick R., Brown G., Joachimiak A., Savchenko A., Yakunin A.F.: The CRISPR-associated Cas4 protein Pcal_0546 from *Pyrobaculum calidifontis* contains a [2Fe-2S] cluster: crystal structure and nuclease activity. *Nucleic Acids Res.*, 2014; 42: 11144-11155
- [42] Li H.L., Fujimoto N., Sasakawa N., Shirai S., Ohkame T., Sakuma T., Tanaka M., Amano N., Watanabe A., Sakurai H., Yamamoto T., Yamanaka S., Hotta A.: Precise correction of the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*, 2015; 4: 143-154
- [43] Lin Y., Cradick T.J., Brown M.T., Deshmukh H., Ranjan P., Sarode N., Wile B.M., Vertino P.M., Stewart F.J., Bao G.: CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res.*, 2014; 42: 7473-7485
- [44] Liu Y., Ma S., Wang X., Chang J., Gao J., Shi R., Zhang J., Lu W., Liu Y., Zhao P., Xia Q.: Highly efficient multiplex targeted mutagenesis and genomic structure variation in *Bombyx mori* cells using CRISPR/Cas9. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 2014; 49: 35-42
- [45] Long C., Amoasii L., Mireault A.A., McAnally J.R., Li H., Sanchez-Ortiz E., Bhattacharyya S., Shelton J.M., Bassel-Duby R., Olson E.N.: Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*, 2016; 351: 400-403
- [46] Long C., McAnally J.R., Shelton J.M., Mireault A.A., Bassel-Duby R., Olson E.N.: Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*, 2014; 345: 1184-1188

- [47] Ma H., Naseri A., Reyes-Gutierrez P., Wolfe S.A., Zhang S., Pederson T.: Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015; 112: 3002-3007
- [48] Ma S., Chang J., Wang X., Liu Y., Zhang J., Lu W., Gao J., Shi R., Zhao P., Xia Q.: CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of *BmKu70* in *Bombyx mori*. *Sci. Rep.*, 2014; 4: 4489
- [49] Ma Y., Zhang X., Shen B., Lu Y., Chen W., Ma J., Bai L., Huang X., Zhang L.: Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. *Cell Res.*, 2014; 24: 122-125
- [50] Maddalo D., Machado E., Concepcion C.P., Bonetti C., Vidigal J.A., Han Y.C., Ogrodowski P., Crippa A., Rekhman N., de Stanchina E., Lowe S.W., Ventura A.: In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature*, 2014; 516: 423-427
- [51] Maeder M.L., Linder S.J., Cascio V.M., Fu Y., Ho Q.H., Joung J.K.: CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat. Methods*, 2013; 10: 977-979
- [52] Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J., Wolf Y.I., Yakunin A.F., van der Oost J., Koonin E.V.: Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2011; 9: 467-477
- [53] Mali P., Aach J., Stranges P.B., Esvelt K.M., Moosburner M., Kosuri S., Yang L., Church G.M.: CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.*, 2013; 31: 833-838
- [54] Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M.: RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013; 339: 823-826
- [55] Marraffini L.A., Sontheimer E.J.: CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 2008; 322: 1843-1845
- [56] Marraffini L.A., Sontheimer E.J.: Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, 2010; 463: 568-571
- [57] Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Almendros C.: Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 2009; 155: 733-740
- [58] Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Soria E.: Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.*, 2005; 60: 174-182
- [59] Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Soria E., Juez G.: Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.*, 2000; 36: 244-246
- [60] Mussolino C., Morbitzer R., Lütge F., Dannemann N., Lahaye T., Cathomen T.: A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39: 9283-9293
- [61] Nelson C.E., Hakim C.H., Ousterout D.G., Thakore P.I., Moreb E.A., Rivera R.M., Madhavan S., Pan X., Ran F.A., Yan W.X., Asokan A., Zhang F., Duan D., Gersbach C.A.: In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 2016; 351: 403-407
- [62] Niu Y., Shen B., Cui Y., Chen Y., Wang J., Wang L., Kang Y., Zhao X., Si W., Li W., Xiang A.P., Zhou J., Guo X., Bi Y., Si C. i wsp: Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014; 156: 836-843
- [63] Pattanayak V., Lin S., Guilinger J.P., Ma E., Doudna J.A., Liu D.R.: High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.*, 2013; 31: 839-843
- [64] Pennisi E.: The CRISPR craze. *Science*, 2013; 341: 833-836
- [65] Perez E.E., Wang J., Miller J.C., Jouvenot Y., Kim K.A., Liu O., Wang N., Lee G., Bartsevich V.V., Lee Y.L., Guschin D.Y., Rupniewski I., Waite A.J., Carpenito C., Carroll R.G. i wsp: Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.*, 2008; 26: 808-816
- [66] Perez-Pinera P., Kocak D.D., Vockley C.M., Adler A.F., Kabadi A.M., Polstein L.R., Thakore P.I., Glass K.A., Ousterout D.G., Leong K.W., Guilak F., Crawford G.E., Reddy T.E., Gersbach C.A.: RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat. Methods*, 2013; 10: 973-976
- [67] Price C.M.: Fluorescence in situ hybridization. *Blood Rev.*, 1993; 7: 127-134
- [68] Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A.: Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013; 152: 1173-1183
- [69] Ran F.A., Cong L., Yan W.X., Scott D.A., Gootenberg J.S., Kriz A.J., Zetsche B., Shalem O., Wu X., Makarova K.S., Koonin E.V., Sharp P.A., Zhang F.: In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015; 520: 186-191
- [70] 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.: Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013; 154: 1380-1389
- [71] Rouet P., Smih F., Jasin M.: Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 6064-6068
- [72] Rudin N., Sugarman E., Haber J.E.: Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1989; 122: 519-534
- [73] Samai P., Pyenson N., Jiang W., Goldberg G.W., Hatoum-Aslan A., Marraffini L.A.: Co-transcriptional DNA and RNA Cleavage during Type III CRISPR-Cas Immunity. *Cell*, 2015; 161: 1164-1174
- [74] Sinkunas T., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V.: Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J.*, 2011; 30: 1335-1342
- [75] Tabebordbar M., Zhu K., Cheng J.K., Chew W.L., Widrick J.J., Yan W.X., Maesner C., Wu E.Y., Xiao R., Ran F.A., Cong L., Zhang F., Vandenberghe L.H., Church G.M., Wagers A.J.: In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, 2016; 351: 407-411
- [76] Tachibana M., Sparman M., Ramsey C., Ma H., Lee H.S., Penedo M.C., Mitalipov S.: Generation of chimeric rhesus monkeys. *Cell*, 2012; 148: 285-295
- [77] Tan W., Carlson D.F., Lancto C.A., Garbe J.R., Webster D.A., Hackett P.B., Fahrenkrug S.C.: Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: 16526-16531
- [78] Tebas P., Stein D., Tang W.W., Frank I., Wang S.Q., Lee G., Spratt S.K., Surosky R.T., Giedlin M.A., Nichol G., Holmes M.C., Gregory P.D., Ando D.G., Kalos M., Collman R.G. i wsp: Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.*, 2014; 370: 901-910
- [79] Thompson A.J., Yuan X., Kudlicki W., Herrin D.L.: Cleavage and recognition pattern of a double-strand-specific endonuclease (I-crel) encoded by the chloroplast 23SrRNA intron of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, 1992; 119: 247-251
- [80] Tsai S.Q., Wyvekens N., Khayter C., Foden J.A., Thapar V., Reyon D., Goodwin M.J., Aryee M.J., Joung J.K.: Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.*, 2014; 32: 569-576
- [81] Vasquez K.M., Marburger K., Intody Z., Wilson J.H.: Manipulating

the mammalian genome by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 8403-8410

- [82] Wang W., Ye C., Liu J., Zhang D., Kimata J.T., Zhou P.: CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. *PLoS One*, 2014; 9: e115987
- [83] Wang X., Wang Y., Wu X., Wang J., Wang Y., Qiu Z., Chang T., Huang H., Lin R.J., Yee J.K.: Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat. Biotechnol.*, 2015; 33: 175-178
- [84] Wang Y., Fan N., Song J., Zhong J., Guo X., Tian W., Zhang Q., Cui F., Li L., Newsome P.N., Frampton J., Esteban M.A., Lai L.: Generation of knockout rabbits using transcription activator-like effector nucleases. *Cell Regen*, 2014; 3: 3
- [85] Westra E.R., Semenova E., Datsenko K.A., Jackson R.N., Wiedenheft B., Severinov K., Brouns S.J.: Type I-E CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS Genet*, 2013; 9: e1003742
- [86] Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna J.A.: RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012; 482: 331-338
- [87] Wyvekens N., Topkar V.V., Khayter C., Joung J.K., Tsai S.Q.: Dimeric CRISPR RNA-guided FokI-dCas9 nucleases directed by truncated gRNAs for highly specific genome editing. *Hum. Gene Ther.*, 2015; 26: 425-431
- [88] Xiao A., Wang Z., Hu Y., Wu Y., Luo Z., Yang Z., Zu Y., Li W., Huang P., Tong X., Zhu Z., Lin S., Zhang B.: Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res.*, 2013; 41: e141
- [89] Xie F., Ye L., Chang J.C., Beyer A.I., Wang J., Muench M.O., Kan Y.W.: Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res.*, 2014; 24: 1526-1533
- [90] Yan Q., Zhang Q., Yang H., Zou Q., Tang C., Fan N., Lai L.: Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system. *Cell Regen*, 2014; 3: 12
- [91] Yang H., Wang H., Shivalila C.S., Cheng A.W., Shi L., Jaenisch R.: One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013; 154: 1370-1379
- [92] Yin H., Xue W., Chen S., Bogorad R.L., Benedetti E., Grompe M., Kotliansky V., Sharp P.A., Jacks T., Anderson D.G.: Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.*, 2014; 32: 551-553
- [93] Yin L., Maddison L.A., Li M., Kara N., LaFave M.C., Varshney G.K., Burgess S.M., Patton J.G., Chen W.: Multiplex conditional mutagenesis using transgenic expression of Cas9 and sgRNAs. *Genetics*, 2015; 200: 431-441
- [94] Yosef I., Goren M.G., Qimron U.: Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 2012; 40: 5569-5576
- [95] Zhang J., Kasciukovic T., White M.F.: The CRISPR associated protein Cas4 is a 5' to 3' DNA exonuclease with an iron-sulfur cluster. *PLoS One*, 2012; 7: e47232
- [96] Zhang J., Rouillon C., Kerou M., Reeks J., Brugger K., Graham S., Reimann J., Cannone G., Liu H., Albers S.V., Naismith J.H., Spagnolo L., White M.F.: Structure and mechanism of the CMR complex for CRISPR-mediated antiviral immunity. *Mol. Cell*, 2012; 45: 303-313
- [97] Zhang Y., Ge X., Yang F., Zhang L., Zheng J., Tan X., Jin Z.B., Qu J., Gu F.: Comparison of non-canonical PAMs for CRISPR/Cas9-mediated DNA cleavage in human cells. *Sci. Rep.*, 2014; 4: 5405

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.