

## STRESZCZENIE

Wynalezienie CRISPR jest uważane za jedno z najbardziej przełomowych odkryć ostatnich lat w dziejach biologii, biotechnologii, medycyny, ale i przemysłu farmaceutycznego czy rolniczego. Metody opracowane przy użyciu CRISPR stwarzają nowe, wcześniej nieosiągalne możliwości, które mogą znacząco wpłynąć na poprawę komfortu życia. Od czasu wynalezienia tego inteligentnego systemu immunologicznego aż do chwili obecnej wykonano wiele badań z wykorzystaniem systemów CRISPR/Cas. Efektem tych badań było wytworzenie nowoczesnego narzędzia do manipulacji genetycznej, które pozwala na wprowadzenie wielu modyfikacji w obrębie DNA, które mogą przyczynić się do wyciszenia ekspresji danych genów bądź ich nadekspresji poprzez np. mutacje czy delecje. W pracy opisano zastosowania metody do manipulacji genetycznych z wykorzystaniem systemu zaliczanego do klasy drugiej – CRISPR/Cas9 oraz zalety tej metody i jej przewagę nad wcześniej wykorzystywanymi narzędziami inżynierii genetycznej, jak również jej ograniczenia i wady, które w znacznym stopniu zawężają możliwość jej zastosowania. Przedstawiono również potencjalne możliwości wykorzystania metody oraz przeprowadzone badania z użyciem CRISPR/Cas9.

## WPROWADZENIE

CRISPR/Cas9 odkryto po raz pierwszy w 1987 u *Escherichia coli* podczas badania aktywności genu *iap* w genomie bakterii [1,2]. Obserwacje inteligentnego systemu obronnego obecnego u archea i u bakterii umożliwiły skonstruowanie narzędzia do manipulacji genetycznej, którego głównymi elementami składowymi są: sgRNA (small guide RNA) odpowiedzialny za naprowadzenie polipeptydu Cas9 na odpowiedni fragment docelowego DNA oraz białko Cas9 – opatrzone w dwie domeny HNH oraz RuvC, z których pierwsza dokonuje cięcia nici komplementarnej względem sgRNA, a druga przecina sekwencję niekomplementarną (w obrębie drugiego łańcucha polinukleotydowego) [3-7]. Ostateczny wynik wprowadzonych modyfikacji jest w znacznym stopniu zależny od dwóch procesów HDR i NHEJ uaktywniających się w komórce w efekcie generowania przez system CRISPR/Cas9 pęknięć obu łańcuchów podwójnej helisy – DSB [6,8]. Ze względu na mały udział HDR w naprawie pęknięć DNA i wymóg dostarczenia odpowiedniej matrycy niezbędnej do odbudowy, system narażony jest na liczne mutacje występujące poza sekwencją docelową, będące często rezultatem działania podatnego na błędy mechanizmu NHEJ, aktywnego w większości badanych komórek [6,8-14].

## KLUCZOWE ELEMENTY SKŁADOWE KONSTRUKTU

CRISPR/Cas definiuje się jako nabyty, adaptacyjny system obronny [3,13,15-18]. Został on zidentyfikowany u ok. 40% bakterii z dotychczas zsekwencjonowanym genomem oraz u ok. 90% przedstawicieli archea [5,13,19,20]. CRISPR (Clustered Regularly – Interspaced Short Palindromic Repeats and associated proteins) w dosłownym tłumaczeniu oznacza zgrupowane, regularnie poprzedzielane, krótkie palindromiczne sekwencje powtórzone oraz powiązane z nimi białka [21]. CRISPR/Cas stanowi linię obrony przeciwko infekującym genom kwasami nukleinowymi pochodzącymi z bakteriofagów, plazmidów lub innych ruchomych elementów genetycznych [15,17,18].

## LOCUS CRISPR/Cas

Locus CRISPR/Cas tworzy nieskomplikowaną strukturę, złożoną z dwóch głównych elementów, do których zaliczamy region CRISPR oraz geny *Cas* [18,22-24]. W obrębie CRISPR występują trzy komponenty: licznie powtórzone konserwatywne sekwencje palindromowe o podobnej długości, wy-

lic. Dalia Blicharska<sup>1</sup>,

dr Izabela Szućko-Kociuba<sup>1,2</sup>,

dr inż. Ewa Filip<sup>1,2</sup>,

dr hab. Lidia Skuza, prof.  
US<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup>Instytut Biologii, Uniwersytet Szczeciński

<sup>2</sup>Centrum Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Instytut Biologii, Uniwersytet Szczeciński

[https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_453](https://doi.org/10.18388/pb.2021_453)

✉ autor korespondujący: lidia.skuza@usz.edu.pl

**Słowa kluczowe:** CRISPR, Cas9, inżynieria genetyczna, off-target

**Zastosowane skróty:** CRISPR – Clustered Regularly – Interspaced Short Palindromic Repeats and associated proteins; crRNA – crispr RNA; DSBs – Double Strand Breaks – pęknięcia w obrębie obu nici podwójnej helisy; GDS – Gene Delivery Systems; HDR – Homology Direct Repair; NHEJ – Non-Homologous End Joining; PAM – Protospacer Adjacent Motif; sgRNA – small guide RNA; SSBs – Single Strand Breaks – pęknięcia w obrębie jednej nici podwójnej helisy; tracrRNA – trans-activating crispr RNA

noszącej od 28 do 37 par zasad; unikatowe, różniące się od siebie sekwencje separujące o zbliżonej długości oraz sekwencja prowadząca „leader sequence” [2,17,25-29].

### SEKWENCJE PRZERYWNIKOWE

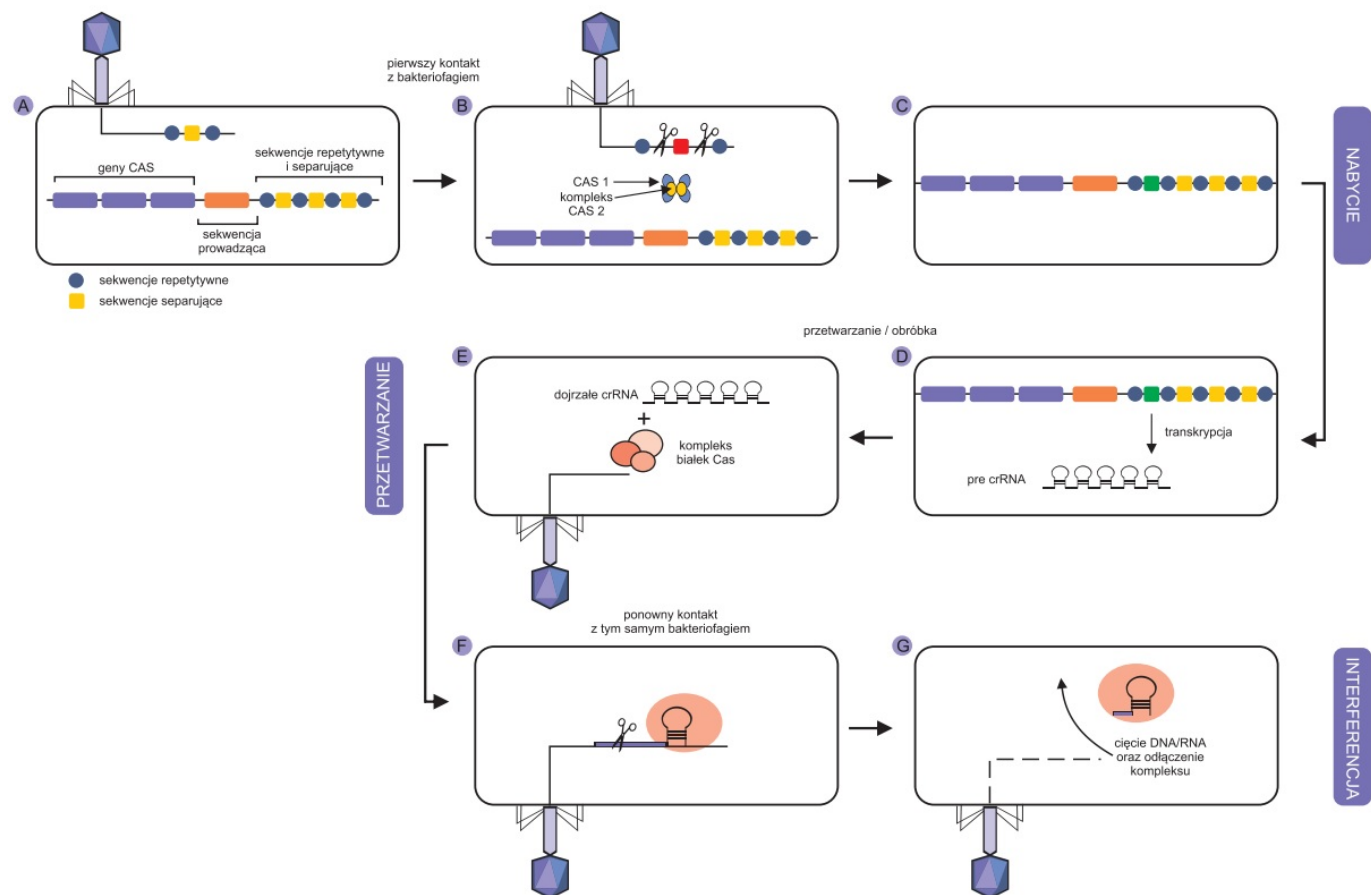
Kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej odgrywają sekwencje przerywnikowe – „spacers”, powstałe w wyniku wprowadzenia do regionu CRISPR obcych odcinków kwasów nukleinowych określanymi jako „protospacers” [13,17,29,30]. Fragmenty te stanowią pewnego rodzaju pamięć immunologiczną, pozwalającą rozpoznać atakujące genom DNA lub RNA, z którym wcześniej organizm miał już styczność [20,29]. Sekwencje przerywnikowe służą jako matryca do późniejszego wytworzenia crRNA (crispr RNA), biorącego czynny udział w identyfikacji inwazyjnych jednostek, dzięki czemu następuje ich cięcie oraz interferencja zawartej informacji genetycznej [2,6,13,30-32]. Liczba takich unikatowych fragmentów jest zróżnicowana w zależności od gatunku: od kilku do kilkuset [20,29].

### SEKWENCJA PROWADZĄCA

„Leader sequence” to fragment o długości ok. 200-500 pz, występujący powyżej *loci* CRISPR, bogaty w adeninę i tyminę [2]. Element ten stanowi promotor, który reguluje transkrypcję informacji zawartej w regionie CRISPR, odpowiada więc za wytworzenie crRNA oraz wprowadzenie do genomu gospodarza nowych sekwencji separujących [2,25,27,29,33-35].

### GENY *Cas*

Geny *Cas* kodują informację genetyczną niezbędną do wytworzenia białek z klasy *Cas*, które stanowią szkielet całego systemu [2,29]. Polipeptydy warunkują aktywność enzymatyczną, dzięki której możliwe jest wprowadzenie nowych sekwencji separujących, jak również degradacja atakujących organizm kwasów nukleinowych [2,30,36-39]. Białka te zidentyfikowane zostały tylko u tych bakterii i archea, u których wykryto również obecność loci CRISPR. Geny kodujące *Cas* obserwuje się powyżej regionu CRISPR. W obrębie dotychczas poznanych systemów zidentyfikowano kilka rodzajów białek, różniących się nieco między sobą, co umożliwiło ich podział na typy i podtypy [29,40,41]. Istnieje jednak wyjątek, do którego zaliczamy białka *Cas1* i *Cas2* obecne w każdym układzie CRISPR/*Cas*. Są one niezbędne do pierwszego etapu adaptacji, odpowiadają bowiem za nabycie nowych sekwencji separujących. Na tej podstawie białko *Cas1* zostało uznane za marker umożliwiający wykrycie w obrębie danego organizmu obecności tego wyjątkowego systemu immunologicznego [2,26,30,38,39]. Zespół Makarovej [42] dokonał również podziału polipeptydów *Cas* ze względu na ich funkcje, efektem czego powstały 4 grupy: adaptacyjne, do których włączone zostały białka biorące udział w etapie adaptacji; interferencyjne – tnące atakujące, egzogenne cząsteczki; ekspresyjne – biorące udział w dojrzewaniu crRNA i łączeniu się z pożądanym fragmentem oraz pomocnicze – pełniące rolę regulatorową i wspomagającą [29,42].



Rycina 1. Sposób nabywania odporności na obce kwasy nukleinowe przez niektóre bakterie i archea – nabyty adaptacyjny system immunologiczny.

Sposób działania systemu można podzielić na trzy główne etapy: adaptacja sekwencji separujących, przetwarzanie i interferencja (Ryc. 1). Każdy z tych procesów odgrywa kluczową rolę w przebiegu obrony organizmu przed atakującymi go obcymi kwasami nukleinowymi [2,6,43,44].

Etap I: adaptacja (na podstawie przebiegu procesu u *E. coli*)

W tym etapie najważniejszą rolę odgrywają białka Cas1 i Cas2, tworzące heteroheksamer (u *E. coli*) odpowiedzialny za wycięcie DNA z egzogenego kwasu nukleinowego „protospacer”, w wyniku czego powstaje sekwencja separująca, która następnie przy pomocy tych polipeptydów jest włączana do genomu gospodarza na samym końcu sekwencji prowadzącej „lider sequence” (Ryc. 1B–C) [2,29,39,45,47]. Nukleolityczny kompleks Cas1-Cas2 zbudowany jest z dwóch dimerów Cas1 (Cas1a, Cas1a', Cas1b, Cas1b') oraz z jednego dimeru Cas2 [29,47]. Wybór fragmentu egzogenego DNA przeznaczonego do wycięcia i następnie inkorporacji oraz jego późniejsze położenie w obrębie *loci* CRISPR jest zależne od motywów PAM (Protospacer Adjacent Motif). Są to specyficzne dla danego gatunku bakterii oraz podtypu systemu CRISPR/Cas regiony, zbudowane z trzech do pięciu nukleotydów, znajdujące się w sąsiedztwie docelowej sekwencji [6,29,43,47]. W początkowym etapie Cas1 wyszukuje komplementarną sekwencję PAM, po czym przyłącza się do niej [24,29]. W tym momencie tyrozyna obecna w podjednostkach Cas1 wyznacza region DNA przeznaczony do wycięcia, a Cas2 stabilizuje wybrany fragment. W wyniku tego procesu powstaje nietypowa struktura: po obu stronach kompleksu w pozycji 3' zwisają sekwencje o długości minimum 7 nukleotydów. W kolejnym kroku następuje wytworzenie dojrzałego „protospacer'a” (niedojrzała forma późniejszego „spacer'a”), poprzez usunięcie znajdujących się w pozycji 5, 6 i 7 trzech nukleotydów stanowiących PAM.

Efektom tego procesu wytworzony zostaje odcinek o długości 33 nt. zakończony dwoma grupami hydroksylowymi w pozycji 3' [29,47,48]. Ostatnim etapem jest włączenie takiego odcinka do regionu CRISPR, które odbywa się przy pomocy heteroheksameru poprzez nukleofilny atak na oba końce 5' znajdujące się właśnie w obrębie *loci* CRISPR [29,47].

Etap II: biogeneza crRNA i przetwarzanie

Etap ten rozpoczyna się transkrypcją informacji zawartej w obrębie *locus* CRISPR z wytworzeniem prekursorowego crRNA (pre-crRNA), które jest następnie rozcinane na małe jednostki z użyciem białek Cas lub rybonukleaz (różne, w zależności od typu systemu CRISPR), formując dojrzałe crRNA (Ryc. 1D–E) [3,18,22,29,49]. W celu wytworzenia ostatecznej formy crRNA następuje faza przycinania dokonywana przez mechanizm działający na zasadzie linijki. W przypadku systemów typu drugiego proces ten dokonywany jest na końcu 5', natomiast w przypadku systemu typu pierwszego modyfikacja ta zachodzi na końcu 3' [29,50].

Etap III: interferencja

W tym etapie dochodzi do wyciszenia obcych fragmentów genetycznych [29]. Za przebieg tego procesu odpowiadają cząsteczki crRNA, które nakierowują odpowiednie białka z klasy Cas na komplementarną sekwencję PAM w obrębie egzogenych kwasów nukleinowych [3,18,22]. Dojrzałe crRNA wraz z polipeptydami tworzy macierze, które po rozpoznaniu PAM przyłączają się do obcego elementu genetycznego, powodując jego rozwinięcie, co prowadzi do wytworzenia trzyniciowej struktury pętli R (R-loop) (w przypadku systemów CRISPR/Cas typu pierwszego) (Ryc. 1E–F) [29,51,52]. Następnie odpowiednie jednostki o właściwościach endonukleaz przyłączają się do takiego układu przeprowadzając cięcie. Wynikiem takiego działania jest interferencja genów niesionych przez obcą cząsteczkę DNA lub RNA [3,18,22].

## GŁÓWNE KOMPONENTY SYSTEMU CRISPR/ Cas9 ORAZ EFEKTY ICH DZIAŁANIA

sgRNA

Głównymi elementami składowymi tego systemu, analogicznie jak w przypadku systemu immunologicznego, są sgRNA (small guide RNA) oraz białko Cas9 (Ryc. 2) [3,6]. sgRNA to cząsteczka RNA o długości ok. 20 nt., zbudowana crRNA połączonego z częściowo komplementarnym tracrRNA (*trans-activating crisper RNA*) [3,8,28,53]. Oba rodzaje RNA tworzą razem kompleks stanowiący rusztowanie dla białka Cas, odpowiedzialny za naprowadzenie polipeptydu Cas9 na odpowiedni fragment DNA docelowego [3,5]. tracrRNA pełni istotną rolę w obróbce pre-crRNA co prowadzi do wytworzenia dojrzałej formy crRNA [2,3,13,54]. Rozpoznanie odpowiedniej sekwencji DNA oraz przyłączenie się do niej systemu CRISPR/Cas9 jest zależne od sekwencji PAM, która w przypadku systemu typu drugiego zbudowana jest z trzech nukleotydów 5'-NGG-3' [8,55]. Po identyfikacji takiej sekwencji, Cas9 rozwija skoncentrowaną strukturę DNA w wyznaczonym miejscu, dzięki czemu następuje dopasowanie sgRNA do wyeksponowanego fragmentu łańcucha polipeptydowego [8,9,14,56]. Efektom tego procesu jest hybrydyzacja sgRNA z DNA docelowym [3,14].

Cas9

Cas9 wykazuje aktywność endonukleazy, przecinając sekwencje DNA docelowego na obu jego niciach [3,14]. Tę właściwość białko zawdzięcza obecności dwóch domen: HNH oraz RuvC, z których pierwsza dokonuje cięcia nici komplementarnej względem sgRNA, a druga przecina sekwencję niekomplementarną (w obrębie drugiego łańcucha polinukleotydowego) [4,7,57]. Cięcie następuje zazwyczaj za trzecim bądź za czwartym nukleotydem występującym powyżej PAM [6,9]. Przerwanie nici polinukleotydowych następuje po etapie hybrydyzacji DNA z kompleksem. Efektom tego działania jest wytworzenie tępych końców w miejscu cięcia cząsteczki DNA [4,5,7]. W następnym etapie dochodzi do naprawy obu nici poprzez złączenie wcześniej rozerwanych końców przy użyciu specjalnego systemu naprawczego. W zależności od warunków środowiska jak i rodzaju komórki istnieją dwie możliwe drogi regeneracji DNA: pierwsza z użyciem systemu NHEJ (*Non-Homologous*

indel. HDR może być więc stosowany w celu tworzenia zamierzonych mutacji w oczekiwanym *locus* [28,29,61].

## MODYFIKACJE W OBRĘBIE SYSTEMU CRISPR/CAS9

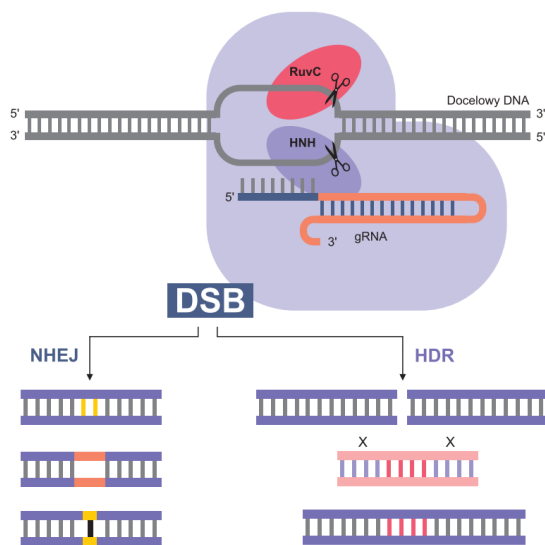
Opracowano również inne sposoby na inaktywację danych genów poprzez wprowadzenie mutacji w obrębie obu domen białka Cas9 (RuvC oraz HNH) [29,62]. W wyniku tego działania powstało tak zwane „martwe” białko Cas9 (dCas9), które pozbawione zostało aktywności endonukleazy [13,29,62,63]. Mimo tych modyfikacji polipeptyd tworzący kompleks z sgRNA mógł wciąż przyłączać się do oczekiwanego regionu DNA. Tak dołączone białko miało za zadanie zatrzymać transkrypcję danego genu poprzez inhibicję polimerazy RNA, uniemożliwiając jej przyłączenie do sekwencji DNA [13,29,63-66].

Natomiast w celu aktywacji transkrypcji stworzono konstrukcję dCas9, który wiąże się do podjednostki  $\omega$  polimerazy RNA, wywołując przy tym pozyskanie, przyłączenie i aktywację polimerazy. W rezultacie tego procesu następuje kumulacja działania RNAP (polimeraza RNA), co wywołuje wzmożoną transkrypcję danego regionu podwójnej helisy [29,64-66].

## SPOSOBY WPROWADZANIA GOTOWYCH KONSTRUKTÓW DO KOMÓREK DOCELOWYCH

Dotychczas poznano wiele różnych możliwości na wprowadzenie obcego DNA bądź RNA do komórki gospodarza. W celu uzyskania jak najlepszych efektów eksperymentalnej modyfikacji genów w obrębie określonego genomu, skonstruowano innowacyjne metody wprowadzania systemów CRISPR/Cas do danej komórki, które jednocześnie ograniczyłyby wystąpienie nieoczekiwanych mutacji bądź modyfikacji poza miejscem docelowym [6,67,68]. W tym celu stworzono kilka nowych metod bazujących na dotychczas już poznanych, charakteryzujących się różną skutecznością w zależności od wykorzystywanej do modyfikacji tkanki [29,69].

Wszystkie dotychczas wytworzone systemy odpowiedzialne za dostarczanie materiału genetycznego do komórek docelowych to GDS (*Gene Delivery Systems*). Powstałe metody wprowadzania egzogenego DNA lub RNA można podzielić na dwie grupy: systemy niewykorzystujące wirusa jako nośnika oraz systemy bazujące na wirusach pełniących rolę cząsteczek przekaźnikowych. Pierwsza grupa reprezentuje metody chemiczne – bazujące na wykorzystaniu syntetycznych nośników oraz metody fizyczne – pozbawione jakiegokolwiek nośnika materiału genetycznego [14,70,71]. Do tej kategorii można zaliczyć elektroporację i mikroiniekcje, które są najbardziej optymalnymi procedurami w przypadku wykorzystania CRISPR/Cas w celu projektowania docelowych komórek macierzystych oraz zygot [29,72-75]. Elektroporacja pozwala na wprowadzenie małych cząsteczek do komórki gospodarza dzięki zwiększeniu przepuszczalności błony komórkowej w wyniku działania na nią odpowiednio dostosowanymi impulsami elektrycznymi [76]. Mikroiniekcja natomiast to proces polegający na wprowadzaniu bezpośrednio do komórki gotowych systemów przy użyciu cienkiej szklanej igły z osadzonymi na jej



**Rycina 2.** Składowe konstruktów CRISPR/Cas9 oraz systemy naprawy DSB. RuvC – domena nukleolityczna dokonuje cięcia DNA w obrębie nici komplementarnej względem sgRNA, HNH – domena nukleolityczna dokonuje cięcia DNA w obrębie nici niekomplementarnej w stosunku do sgRNA; gRNA – odpowiada za naprowadzenie polipeptydu Cas9 na odpowiedni fragment docelowego DNA, które ma ulec edycji, DSB – pęknięcia w obrębie obu nici podwójnej helisy, NHEJ – podatny na błędy system naprawczy, wykazujący aktywność we wszystkich komórkach; HDR – system o wysokiej poprawności, lecz niskiej efektywności, aktywny jedynie w komórkach zdolnych do podziału, wymaga obecności matrycy).

*End Joining*), druga z wykorzystaniem HDR (*Homology-Direct Repair*) [8,14,58]. Etap ten pełni kluczową rolę w procesie edycji genów, od niego bowiem zależy jaki będzie efekt końcowy dokonanych modyfikacji w obrębie genomu [6,9].

## SYSTEMY NAPRAWY PĘKNIĘĆ PODWÓJNEJ HELISY

NHEJ to podatny na błędy system naprawczy, wykazujący aktywność we wszystkich komórkach (Ryc. 2) [8,11,28]. Podczas naprawy z użyciem tego systemu dochodzi najczęściej do licznych mutacji, takich jak insercje czy delecje w obrębie uszkodzonego fragmentu DNA [9,6]. Takie modyfikacje mogą prowadzić do przesunięcia ramki odczytu, w wyniku czego może nastąpić całkowita utrata aktywności danego genu [12,14,59]. System ten charakteryzuje się wysoką efektywnością naprawy, działa natychmiastowo po zidentyfikowaniu błędu w obrębie podwójnej helisy, przeprowadzając ligację tępych końców z użyciem przypadkowych fragmentów DNA znajdujących się w pobliżu cięcia obu nici [29,60]. Aktywność NHEJ jest więc istotna w przypadku, gdy wynikiem danego doświadczenia miało być wyciszenie ekspresji danego genu [10,13].

HDR to system o wysokiej poprawności, lecz niskiej efektywności, aktywny jedynie w komórkach zdolnych do podziału (Ryc. 2) [4,8,11,14]. Naprawa z użyciem HDR wymaga obecności donora DNA – egzogenie wprowadzonej matrycy naprawczej, której końce będą homologiczne względem regionu terminacyjnego obu miejsc pęknięcia nici [10,13]. System ten pozwala na wprowadzenie precyzyjnych modyfikacji w obrębie docelowej sekwencji DNA, z jednoczesnym wykluczeniem wystąpienia błędów typu

**Tabela 1.** Charakterystyka zidentyfikowanych systemów [wg: 2,6,7,29,44,121].

Faza							
Typ	Adaptacja	Przetwarzanie Wytworzenie dojrzałego crRNA	Interferencja PAM	Sygnaturowe białko	Efektor	Cięcie	
Klasa I	I	Cas1, Cas2, *Cas4	Cas6	3-nukleotydomowa	Cas3	kaskada	SSBs
	III	Cas1, Cas2,	Cas6 i Cas10	Brak informacji	Csm lub Cmr (Cas10)	kaskada	SSBs co każde 6 -nt
	IV	Csf1, Cas5, Cas7	Brak informacji	Brak informacji	Csf1	kaskada	Brak informacji
Klasa II	II	Cas1, Cas2, *Cas4	RNaza typu III	5'-NGG-3'	Cas 9- domena RuvC i HNH	sgRNA w postaci kompleksu crRNA i tracrRNA	DSB
	V	Cas1, Cas2, *Cas4	Cas12, Cas13	5'-YTN-3' lub 5'-TTTN-3'	Cas12	crRNA	DSB
	VI	Cas1, Cas2	Cas12, Cas13	Zamiast PAM istotną rolę odgrywa PFS	Cas13	dwie konserwatywne domeny HRPN o aktywności RNazy	Brak informacji

SSBs – Single Strand Breaks – pęknięcia w obrębie jednej nici podwójnej helisy; DSBs – Double Strand Breaks – pęknięcia w obrębie obu nici podwójnej helisy; PFS – Protospacer Flanking Site; Kaskada – kompleks białek – Multiprotein Cascade Complex; PAM – Protospacer Adjacent Motif

powierzchni cząsteczkami [77]. Metoda ta ze względu na swój inwazyjny charakter może przyczynić się w znacznym stopniu do uszkodzenia struktury komórek, jednocześnie zmniejszając szanse na wprowadzenie oczekiwanych modyfikacji w obrębie danego genomu [29,78]. Mikroiniekcja to dość czasochłonny proces ze względu na fakt, iż odbywa się indywidualnie dla każdej komórki, podczas gdy elektroporacja pozwala na wprowadzenie systemów do wszystkich oczekiwanych komórek jednocześnie [29,73,78]. Metody te jednak wykazały dość niską efektywność przeprowadzania terapii w genomie człowieka – niski poziom sukcesywności w transdukcji komórek docelowych [14,29,79,80]. Kolejnym ograniczeniem jest możliwość zastosowania obu metod jedynie w warunkach *in vitro* [29,73]. Wszystkie metody zaliczane do kategorii GDS są obciążone dużym ryzykiem wystąpienia cytotoksyczności bądź mutagenyzy [14].

Druga grupa reprezentuje procedury wykorzystujące odpowiednio zmodyfikowane wirusy, które w sposób charakterystyczny dla tego typu zespołu inwazyjnych cząsteczek mogą zainfekować docelowy genom [14,81,82]. Wykorzystanie takich patogenów daje wszechstronne możliwości, w szczególności w przypadku leczenia klinicznego zarówno w warunkach *in vitro* jak *in vivo* [29,83]. Dość często stosowanym wirusem jest AAV (Adeno-Associated-Viral), który pozwala na indywidualne dostosowanie metody poprzez wybór odpowiedniego serotypu, w zależności od docelowej tkanki. AAV są najczęściej stosowane w przypadku, gdy geny niosące informacje dotyczą gRNA (guide RNA) oraz kodujące Cas9 występują na dwóch niezależnych kasetach [29,84]. Wadą tego typu procedury jest jednak ograniczona pojemność DNA – 4,7 kp [14,85,86]. AAV to wirus zaliczany do rodzaju *Dependoparvovirus*, zawierający cząsteczkę jednonicowego DNA. Jego charakterystyczną cechą jest

zależność od pozostałych dwóch wirusów – adenowirusa oraz wirusa opryszki zwykłej HSV (Herpes Simplex Virus), bez obecności których AAV nie będzie zdolny do replikacji [14,85,86]. Do chwili obecnej wynaleziono 12 serotypów i ponad 100 różnych wariantów tego wirusa, pozwalających na odpowiednie dostosowanie systemów w zależności rodzaju komórki oraz tkanki wykorzystywanej w doświadczeniu [14,87,88].

W przypadku CRISPR/Cas9 najczęściej stosuje się metody wykorzystujące wektory, które ze względu na ich budowę oraz charakterystykę można podzielić na dwie kategorie. Pierwszą grupę stanowią wektory pojedyncze (single-vector), niosące specjalne kasety ekspresyjne – jedną odpowiadającą za wytworzenie gRNA oraz drugą niosącą informację dotyczącą Cas9. W tym przypadku obie kasety są poddawane procesowi transkrypcji jednocześnie. Drugą kategorię reprezentują wektory binarne (binary-vector systems), które wykorzystują dwa niezależne promotory w celu kontroli ekspresji obu kaset [6, 89].

#### PROCES SYNTEZY sgRNA

sgRNA pełni kluczową rolę w procesie modyfikacji genetycznych, jest bowiem odpowiedzialne za naprowadzenie CRISPR/Cas9 na oczekiwaną sekwencję w celu przeprowadzenia rekombinacji. Z tego względu jego prawidłowa synteza jest etapem krytycznym w procesie konstruowania takiego systemu. Cały konstrukt zbudowany jest z ok. 98 nt., wśród których 20 wyznacza sekwencję docelową [6,90]. W przypadku edycji genomów roślinnych najczęściej zastosowane są promotory U3 i U6, odpowiadające za regulację ekspresji, natomiast polimeraza III czynnie przeprowadza transkrypcje genów [6,13,91,92]. Kasety ekspresyjne (odpo-

wiedni insert) mogą zostać wytworzone poprzez procesy ligacji adaptorów bądź przy pomocy PCR [6,93]. Ze względu na fakt, że produkty ekspresji U6 i U3 uznane zostały za elementy porządkowe, nie mogą one zostać wykorzystane do wytworzenia specyficznych tkankowo i komórkowo gRNA [13,93]. W celu ulepszenia dotychczasowych metod stosowanych do syntezy gRNA, Gao i wsp. (2013) wytworzyli sztuczny gen *RGR*. Był to specyficzny konstrukt mRNA powstały w wyniku transkrypcji, w obrębie którego występowała sekwencja gRNA otoczona z obu stron sekwencjami kodującymi rybozomy, dzięki czemu w wyniku katalitycznego procesu cięcia powstawał gotowy produkt w postaci gRNA [13,91].

## SZANSE I MOŻLIWOŚCI WYNIKAJĄCE Z ZASTOSOWANIA SYSTEMU CRISPR/Cas9

Odkrycie innowacyjnego systemu oraz potencjalne korzyści płynące z jego wykorzystania wywołały wielkie zainteresowanie wśród naukowców, tym samym skłaniając ich do przeprowadzenia bardziej szczegółowych badań w celu wdrożenia nowoczesnej technologii do życia codziennego. W aspekcie gospodarki rolnej głównym założeniem było uzyskanie plonów o lepszej odporności na czynniki stresogenne biotyczne, w tym przede wszystkim na różne rodzaje patogenów chorobotwórczych [6,29,94] i abiotyczne, w tym przede wszystkim na niekorzystne warunki atmosferyczne [6,29,95], a także produkcja owoców bądź warzyw o nieco zmienionych cechach tj. pomidory bez pestek bądź owoce mniejszych rozmiarów, uznawanych za bardziej atrakcyjne [29,96]. Testowano również interakcje organizmów roślinnych z patogenem oraz podstawowe szlaki immunologiczne roślin, wykorzystując w tym celu system CRISPR/Cas9, jednocześnie sprawdzając jaką rolę może pełnić technologia CRISPR/Cas9 w odpowiedzi immunologicznej wybranych gatunków roślin. W badaniach skupiono się na sekwencjach DNA, określanych jako „geny S” odpowiedzialne za występowanie chorób w obrębie organizmów roślinnych [6,97]. Ideą tych doświadczeń było wprowadzenie mutacji (knockout mutations – KO) w obrębie fragmentów podwójnej helisy kodujących geny S, dzięki którym miało dojść do utraty funkcji tych elementów genetycznych [6,98].

W ten sposób przy użyciu CRISPR/Cas9 wykonano pierwsze próby wytworzenia roślin z mutacjami w obrębie genu *CsLOB1* zaobserwowanego w genomie *Citrus paradise*. Zamierzona mutageneza, jaką zaobserwowano w obrębie promotora oraz czynnika transkrypcyjnego *CsLOB1* wywołała utratę funkcji tego konstrukt w wyniku przesunięcia ramki odczytu. Taki zabieg spowodował nabycie odporności rośliny na *Xantomonas citri* [6,99]. Innowacyjny system zapewnia również możliwość wprowadzania modyfikacji w obrębie genomów wirusowych, zidentyfikowanych w organizmach roślinnych, dzięki czemu możliwe jest całkowite usunięcie ryzyka wystąpienia choroby powodowanej przez patogen [6,95]. Niedawno odkryty ortolog *FnCas9* pochodzący z *Francisella novicida* został wykorzystany w celu ograniczenia rozprzestrzeniania się wirusów już wcześniej obecnych w organizmach roślinnych. *FnCas9* wstrzymał replikację wirusa mozaiki zarówno w genomie tytoniu jak i ogórka, zwiększając tym samym ich odporność na ponowny atak [6,100].

Wraz z pojawieniem się licznych publikacji dotyczących możliwości ochrony roślin przy użyciu nowego systemu, rozpoczęły się również badania nad potencjalnymi korzyściami wynikającymi z wykorzystania technologii CRISPR/Cas9 w celu leczenia schorzeń u ludzi. W 2006 roku zespół Makrova zaprojektował CRISPR/Cas9 aby znieść antybiotykooporność obserwowaną w wielu wirulentnych szczepach bakterii [39,101]. Sukcesem zakończyły się również próby naprawy błędu w obrębie genu *CFTR*, występującego u ludzi chorych na mukowiscydozę, które przeprowadzono w warunkach in vitro na organoidach [101,102]. Duże nadzieje wiąże się z potencjalnym zastosowaniem CRISPR/Cas9 w immunoterapii. Głównym założeniem jest wytworzenie limfocytów T, obdarzonych dodatkowym receptorem CAR i odczytujących specyficzne antygeny. Tak przystosowane komórki układu immunologicznego opatrzone dodatkowym elementem rozpoznającym antygeny komórek rakowych, byłyby zdolne do wcześniejszego rozpoznania zagrożenia oraz wywołania szybkiej, dostosowanej reakcji organizmu na postępujący proces kancerogenezy [101,103].

Kolejnym założeniem było odnalezienie zastosowania systemu w walce z zakażeniami bakteryjnymi występującymi w ludzkim organizmie. Zważając na fakt, że system stanowi w rzeczywistości linię obrony w obrębie organizmów bakteryjnych, postanowiono wykorzystać go w celu wywołania odpowiedzi immunologicznej w sytuacji kontaktu z silnie chorobotwórczymi patogenami [15]. Sukcesem zakończyła się próba zahamowania transkrypcji genów *Micobacterium tuberculosis*, bakterii wywołującej gruźlicę. W wyniku wprowadzenia odpowiednio przystosowanego systemu CRISPR/Cas9 z nieaktywną formą Cas9, doszło do zahamowania ekspresji genów bakterii [15,104,105,106].

Zaproponowano również wykorzystanie technologii w celu naprawy sporych insercji obserwowanych w intronach czynników krzepliwości krwi typu VIII u pacjentów chorujących na hemofilię, wykorzystując do doświadczenia komórki śródbłonkowe uzyskane dzięki indukowanym pluripotentnym komórkom macierzystym – iPSC [107]. Eksperyment zakończył się sukcesem, dzięki naprawie mutacji w genie *F8* w komórkach wykorzystanych w próbie oraz ich wszczępieniu do organizmu myszy chorujących na hemofilię stwierdzono zanik choroby [8].

CRISPR/Cas9 daje również potencjalne szanse na leczenie choroby Crohna-Leśniewskiego (SCD), uwarunkowanej wystąpieniem mutacji punktowej w genie kodującym podjednostkę  $\beta$ -hemoglobiny (Gly zamiast Val). Rezultatem tego typu modyfikacji jest nagromadzenie w organizmie hemoglobiny oraz zniekształcenie krwinek czerwonych [8,108,109]. W doświadczeniu sprawdzającym właściwość tezy wykorzystano erytrocyty pozyskane z iPSC oraz odpowiednio przystosowany CRISPR/Cas9 w celu kontroli ekspresji chorego genu. Wynik wprowadzonych zmian okazał się być dużo bardziej obiecujący względem prób przeprowadzanych z użyciem technologii ZFN [8,110].

Badania przeprowadzone przez Yin i wsp. [80] wykazały możliwość walki z tyrozyneią typu I, wywołaną przez mutację punktową w obrębie genu *Fah*. Dziedziczna choro-

ba genetyczna ma związek z ostatnim etapem katabolicznego szlaku rozkładu tyrozyny, do którego nie dochodzi w organizmie osób chorych [80,111-113]. Przyczyną tego jest powstanie, w wyniku mutacji, niekompletnego, niestabilnego enzymu – hydrolazy fumaryloacetooctanu (FAH). U osób chorych w wyniku tranzykcji guaniny na adeninę w obrębie eksonu ósmego, podczas splicingu dochodzi do wycięcia tego fragmentu, efektem czego powstaje niekompletne białko. W eksperymencie przeprowadzonym na komórkach mysich, wykorzystano technologie CRISPR/Cas9 [80,113]. W celu korekcji obecnej mutacji, skonstruowano gRNA skierowane na docelowy fragment – Fah w obrębie genomu oraz jednoniciowy oligonukleotyd stanowiący matrycę do naprawy. Oba konstrukty umieszczono w koekspresyjnym plazmidzie, który wszczepiono do organizmu zwierząt. W efekcie zaobserwowano pozytywny wpływ doświadczenia na komórki z mutacją, dając tym samym początek komórkom pozbawionym niepożądanego modyfikacji oraz sprawnemu białku [80,113].

### OGRANICZENIA CRISPR/Cas9

Technika CRISPR/Cas9 wiąże się również ze znacznymi utrudnieniami i przeszkodami, które uniemożliwiają wykorzystanie tego systemu do leczenia chorób oraz naprawy błędów genetycznych u ludzi [13,29]. Główny problem stanowiącym największe wyzwanie jest charakterystyczna cecha sgRNA – brak specyficzności tych konstruktorów względem wyznaczonych sekwencji docelowych. Jak zauważono, sgRNA potrafi przyłączać się do licznych sekwencji poza docelowymi, wykazujących pewne podobieństwo względem sekwencji oczekiwanej [13,115]. Dotychczas przeprowadzone liczne analizy wykazały, iż fragmenty, do których wiąże się naprowadzający element systemu, mogą różnić się od jednego do nawet sześciu nukleotydów względem sekwencji właściwej [12,28]. Niepożądany proces związania się konstruktów z innym niż oczekiwany fragmentem DNA określa się mianem niedopasowania bądź mutacji występującej poza celowanym odcinkiem podwójnej helisy (off-target mutation) [28,29]. W obrębie organizmów o rozbudowanych genomach dość często spotyka się sekwencje wykazujące pewne podobieństwo, co stanowi znaczną przeszkodę w kontekście wykorzystywania systemów CRISPR/Cas9 w celu wprowadzania zmian w DNA, ze względu na tendencję do tworzenia dopasowań z różnymi fragmentami DNA o nieco odmiennej sekwencji względem oczekiwanej [9,13]. Z uwagi na to niełatwo jest oszacować jaki efekt końcowy przyniesie wykorzystanie danego systemu w celu wprowadzenia pewnych modyfikacji w DNA, a tym samym ciężko jest zaprojektować taki system, który oddziaływałby jedynie z oczekiwanym miejscem w obrębie podwójnej helisy [115]. Niektóre niedopasowania mogą obejmować również nukleotydy występujące w obrębie motywów PAM, tzn. można zaobserwować u nich inną sekwencję niż NGG lub NAG [12,114,116]. Na niekorzyść systemu działa również fakt, iż najpopularniejsza sekwencja PAM – „NGG” wykrywalna przez systemy CRISPR/CAS9 pochodzące z genomu *S. pyogenes*, występuje średnio co 8–12 nukleotydów w obrębie ludzkiego genomu, co jeszcze bardziej ogranicza specyficzność tej metody [9,13,28,114].

Na podstawie wielu badań i analiz dokonano pewnych obserwacji, z których wynika, iż na chwilę obecną nie ma żadnego schematu, który pozwoliłby przewidzieć ile potencjalnych niedopasowań jest tolerowanych przez dany system. Problem stanowi również brak konkretnego uzasadnienia, dlaczego w niektórych miejscach w obrębie DNA komórek dochodzi do cięcia podwójnej helisy, podczas gdy w innych nie da się zaobserwować nukleolitycznego działania konstruktów. Z tego wynika, iż zarówno zrozumienie pojęcia aktywności nukleolitycznej jak i sprecyzowanie specyficzności systemu jest poza zasięgiem [12,114].

Przyłączenie się sgRNA do niedopasowanych sekwencji oraz następujące po tym cięcie warunkują wysoką toksyczność systemu względem komórek [13,29,116,117]. Należy przez to rozumieć, że nieprawidłowe dopasowanie może zapoczątkować onkogenezę, spowodować wyciszenie genów supresorowych danego guza bądź doprowadzić do śmierci komórki [9,13,29,118]. Wszystkie wyżej wymienione efekty mogą być wynikiem zajścia mutagenyzy indukowanej przez system naprawczy NHEJ podatny na liczne błędy [29,115,116]. Zauważono również brak wpływu stopnia metylacji DNA na efektywność działania metody [12,13,114].

Ze względu na wszystkie te ograniczenia poddano technologię CRISPR/Cas9 wielu testom oraz analizom, w celu udoskonalenia metody, minimalizacji skutków ubocznych oraz zrozumienia w pełni istoty jej działania. Dzięki temu powstało kilka narzędzi mających w znacznym stopniu ułatwić konstrukcje odpowiednio dostosowanych, precyzyjnie działających systemów. Zespół Xiao i wsp. [19] stworzył narzędzie CasOT, zdolne do wskazywania potencjalnych sekwencji homologicznych względem docelowej, do których może przyłączyć się dane sgRNA [13,119]. Wykorzystanie endonukleazy I (T7E1) umożliwi natomiast wykrycie większych mutacji typu indel, powstających poza pożądanym odcinkiem DNA [12,116,120]. Powstały również cztery główne tezy dotyczące tematyki mutacji typu off-target:

- najczęstszą modyfikacją występującą w obrębie regionów niedopasowania jest mutacja punktowa indel – delecja bądź insercja;
- mutacje punktowe obserwowane we fragmentach homologicznych najczęściej skutkują przesunięciem ramki odczytu, z tego względu potencjalne ryzyko utraty funkcji danego genu jest istotnie wysokie;
- podział sekwencji docelowych na podstawie badań częstości występowania mutacji indel na 4 główne grupy miejsc wykazujących preferencje do powstawania: dużych delekcji, małych delekcji, małych insercji bądź miejsca pozbawione jakichkolwiek preferencji;
- aktywność konkretnych sgRNA jest zmienna i tym samym trudna do przewidzenia [115];
- zaobserwowano również, iż precyzja dokonywanych modyfikacji różni się w zależności od miejsca wprowadzania zmian w obrębie podwójnej helisy oraz koreluje

z efektywnością edycji oraz typem powstających mutacji typu indel [115].

Pomimo tych wszystkich innowacji oraz analiz dostarczających istotnych informacji na temat CRISPR/Cas9, wiedza na temat systemów jest wciąż niewystarczająca, by w bezpieczny sposób wykorzystywać tę technologię w celu naprawy błędów genetycznych w obrębie ludzkiego genomu [12,13,115].

## PIŚMIENNICTWO

1. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169(12): 5429–5433
2. Richter C, Chang JT, Fineran PC (2012) Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems. *Viruses* 4(10): 2291–2311
3. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816–821
4. Jiang F, Doudna JA (2017) CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys* 46: 505–529
5. Adli M (2018) The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun* 9(1): 1911
6. Razzaq A, Saleem F, Kanwal M, Mustafa G, Yousaf S, Imran Arshad HM, Hameed MK, Khan MS, Joyia FA (2019) Modern Trends in Plant Genome Editing: An Inclusive Review of the CRISPR/Cas9 Toolbox. *Int J Mol Sci* 20(16): 4045
7. Liu Z, Dong H, Cui Y, Cong L, Zhang D (2020) Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microb Cell Fact* 19(1): 172
8. Baliou S, Adamaki M, Kyriakopoulos AM, Spandidos DA, Panayiotidis M, Christodoulou I, Zoumpoulis V (2018) CRISPR therapeutic tools for complex genetic disorders and cancer (Review). *Int J Oncol* 53(2): 443–468
9. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, NY)* 339(6121): 819–823
10. Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohue LK, Harrison MM, Wildonger J, O'Connor-Giles KM (2013) Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* 194(4): 1029–1035
11. Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA (2014) Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife* 3: e04766
12. Sander JD, Joung JK (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotech* 32(4): 347–355
13. Zhang F, Wen Y, Guo X (2014) CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* 23(R1): R40–R46
14. Kantor A, McClements ME, MacLaren RE (2020) CRISPR-Cas9 DNA Base-Editing and Prime-Editing. *Int J Mol Sci* 21(17): 6240
15. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, NY)* 315(5819): 1709–1712
16. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E2579–E2586
17. Barrangou R, Marraffini LA (2014) CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell* 54(2): 234–244
18. Hidalgo-Cantabrana C, Sanozky-Dawes R, Barrangou R (2018) Insights into the Human Virome Using CRISPR Spacers from Microbiomes. *Viruses* 10(9): 479
19. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G (2000) Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microb* 36(1), 244–246
20. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C (2007) The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinform* 8: 172
21. Goede A, Wędrowska E, Golińska J, Chmielarski M (2018) CRISPR i jej potencjalne zastosowania w biomedycynie. Wybrane zagadnienia z zakresu inżynierii genetycznej i biologii molekularnej Red. Maciąg M, Maciąg K, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lubin, str. 111-125
22. Chylinski K, Le Rhun A, Charpentier E (2013) The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biol* 10(5): 726–737
23. Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M, Iavarone AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA (2014) Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science (New York, NY)* 343(6176): 1247997
24. Mojica F, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C (2009) Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading)* 155(Pt 3): 733–740
25. Pul U, Wurm R, Arslan Z, Geissen R, Hofmann N, Wagner R (2010) Identification and characterization of *E coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol Microbiol* 75(6): 1495–1512
26. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 9(6): 467–477
27. Yosef I, Goren MG, Qimron U (2012) Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 40(12): 5569–5576
28. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8(11): 2281–2308
29. Loureiro A, da Silva GJ (2019) CRISPR-Cas: Converting A Bacterial Defence Mechanism into A State-of-the-Art Genetic Manipulation Tool. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 8(1): 18
30. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE (2005) A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 1(6): e60
31. Pennisi E (2013) The CRISPR craze. *Science (New York, NY)* 341(6148): 833–836
32. Bortesi L, Fischer R (2015) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv* 33(1): 41–52
33. Jansen R, van Embden JD, Gaastra W, Schouls LM (2002) Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *OMICS* 6(1): 23–33
34. Agari Y, Sakamoto K, Tamakoshi M, Oshima T, Kuramitsu S, Shinkai A (2010) Transcription profile of *Thermus thermophilus* CRISPR systems after phage infection. *J Mol Biol* 395(2): 270–281
35. Pougach K, Semenova E, Bogdanova E, Datsenko KA, Djordjevic M, Wanner BL, Severinov K (2010) Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 77(6): 1367–1379
36. Jansen R, van Embden JD, Gaastra W, Schouls LM (2002) Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *OMICS* 6(1): 23–33
37. Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV (2002) A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res* 30(2): 482–496
38. Godde JS, Bickerton A (2006) The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *J Mol Evol* 62(6): 718–729
39. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV (2006) A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, func-



- tional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* 1: 7
40. Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin EV (2014) Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* 42(10): 6091–6105
  41. Wright AV, Nuñez JK, Doudna JA (2016) Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. *Cell* 164(1-2): 29–44
  42. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 13(11): 722–736
  43. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* (New York, NY) 321(5891): 960–964
  44. Mohanraju P, Makarova KS, Zetsche B, Zhang F, Koonin EV, van der Oost J (2016) Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science* (New York, NY) 353(6299): 5147
  45. Andersson AF, Banfield JF (2008) Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science* (New York, NY) 320(5879): 1047–1050
  46. Tyson GW, Banfield JF (2008) Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses. *Environ Microbiol* 10(1): 200–207
  47. Nuñez JK, Harrington LB, Kranzusch PJ, Engelman AN, Doudna JA (2015) Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature* 527(7579): 535–538
  48. Wang J, Li J, Zhao H, Sheng G, Wang M, Yin M, Wang Y (2015) Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems. *Cell* 163(4): 840–853
  49. Marraffini LA, Sontheimer EJ (2010) CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genetics* 11(3): 181–190
  50. Hatoum-Aslan A, Maniv I, Marraffini LA (2011) Mature clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats RNA (crRNA) length is measured by a ruler mechanism anchored at the precursor processing site. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(52): 21218–21222
  51. Hayes RP, Xiao Y, Ding F, van Erp PB, Rajashankar K, Bailey S, Wiedenheft B, Ke A (2016) Structural basis for promiscuous PAM recognition in type I-E Cascade from *E. coli*. *Nature* 530(7591): 499–503
  52. Xiao Y, Luo M, Hayes RP, Kim J, Ng S, Ding F, Liao M, Ke A (2017) Structure Basis for Directional R-loop Formation and Substrate Handover Mechanisms in Type I CRISPR-Cas System. *Cell* 170(1): 48–60 e11
  53. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* (Reading) 151(Pt 8): 2551–2561
  54. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471(7340): 602–607
  55. Doudna JA, Charpentier E (2014) Genome editing The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (New York, NY) 346(6213): 1258096
  56. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* (New York, NY) 339(6121): 823–826
  57. Santos R, Amaral O (2019) Advances in Sphingolipidoses: CRISPR-Cas9 Editing as an Option for Modelling and Therapy. *Int J Mol Sci* 20(23): 5897
  58. Mei Y, Wang Y, Chen H, Sun ZS, Ju XD (2016) Recent Progress in CRISPR/Cas9 Technology. *J Genet Genomics* 43(2): 63–75
  59. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V (2008) Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair* 7(10): 1765–1771
  60. Moore JK, Haber JE (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16(5): 2164–2173
  61. Li K, Wang G, Andersen T, Zhou P, Pu WT (2014) Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system. *PLoS One* 9(8): e105779
  62. Bikard D, Jiang W, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA (2013) Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res* 41(15): 7429–7437
  63. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152(5): 1173–1183
  64. Hawkins JS, Wong S, Peters JM, Almeida R, Qi LS (2015) Targeted Transcriptional Repression in Bacteria Using CRISPR Interference (CRISPRi). *Methods Mol Biol* (Clifton, NJ) 1311: 349–362
  65. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F (2015) Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 517(7536): 583–588
  66. Dominguez AA, Lim WA, Qi LS (2016) Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(1): 5–15
  67. Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S (2013) Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotech* 31(8): 691–693
  68. Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu JL, Gao C (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotech* 31(8): 686–688
  69. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE (2008) Analysis of AAV serotypes 1–9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 16(6): 1073–1080
  70. Ramamoorth M, Narvekar A (2015) Non viral vectors in gene therapy—an overview. *J Clin Diagn Res* 9(1), GE01–GE6
  71. Foldvari M, Chen DW, Nafissi N, Calderon D, Narsineni L, Rafiee A (2016) Non-viral gene therapy: Gains and challenges of non-invasive administration methods. *J Control Release* 240: 165–190
  72. Horii T, Arai Y, Yamazaki M, Morita S, Kimura M, Itoh M, Abe Y, Hatada I (2014) Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Sci Rep* 4: 4513
  73. Kaneko T, Sakuma T, Yamamoto T, Mashimo T (2014) Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci Rep* 4: 6382
  74. Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Crénéguy A, Brusselle L, Anegón I, Menchaca A (2015) Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PLoS One* 10(8): e0136690
  75. Véron N, Qu Z, Kipen PA, Hirst CE, Marcelle C (2015) CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Dev Biol* 407(1): 68–74
  76. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD (2019) Electroporation. *Cold Spring Harbor protocols* 2019(7): 10 1101/pdb top096271
  77. Polskie Towarzystwo Biologii Komórki, Polskie Towarzystwo Anatomiczne (1995) *Post Biol Komórki*, 22(1): 1–100
  78. Zhang Y, Yu LC (2008) Single-cell microinjection technology in cell biology. *BioEssays* 30(6): 606–610
  79. Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, Cai W, Yang G, Bronson R, Crowley DG, Zhang F, Anderson DG, Sharp PA, Jacks T (2014) CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* 514(7522): 380–384
  80. Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Kotliansky V, Sharp PA, Jacks T, Anderson DG (2014) Genome editing with

- Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotech* 32(6): 551–553
81. Kotterman MA, Chalberg TW, Schaffer DV (2015) Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook. *Annu Rev Biomed Eng* 17: 63–89
  82. Lundstrom K (2018) Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases (Basel, Switzerland)* 6(2): 42
  83. Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li Y, Trombetta J, Sur M, Zhang F (2015) In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotech* 33(1): 102–106
  84. Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng G, Sharp PA, Zhang F (2014) CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* 159(2): 440–455
  85. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR (2017) Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs* 31: 317–334
  86. Wang D, Tai P, Gao G (2019) Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov* 18(5): 358–378
  87. Lee EJ, Guenther CM, Suh J (2018) Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors: Rational Design Strategies for Capsid Engineering. *Curr Opin Biomed Eng* 7: 58–63
  88. Li C, Samulski RJ (2020) Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 21(4): 255–272
  89. Lowder LG, Zhang D, Baltus NJ, Paul JW 3rd, Tang X, Zheng X, Voytas DF, Hsieh TF, Zhang Y, Qi Y (2015) A CRISPR/Cas9 Toolbox for Multiplexed Plant Genome Editing and Transcriptional Regulation. *Plant Physiol* 169(2): 971–985
  90. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156(5): 935–949
  91. Gao Y, Zhao Y (2014) Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *J Integr Plant Biol* 56(4): 343–349
  92. Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J (2013) Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotech* 31(8): 688–691
  93. Xie K, Yang Y (2013) RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant* 6(6): 1975–1983
  94. Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman N, Sherman A, Arazi T, Gal-On A (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol* 17(7): 1140–1153
  95. Zaidi SS, Tashkandi M, Mansoor S, Mahfouz MM (2016) Engineering Plant Immunity: Using CRISPR/Cas9 to Generate Virus Resistance. *Front Plant Sci* 7: 1673
  96. Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, Hakimi SM, Mo H, Habben JE (2017) ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J* 15(2): 207–216
  97. Wang F, Wang C, Liu P, Lei C, Hao W, Gao Y, Liu YG, Zhao K (2016) Enhanced Rice Blast Resistance by CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis of the ERF Transcription Factor Gene OsERF922. *PLoS One* 11(4): e0154027
  98. Zhou J, Peng Z, Long J, Sosso D, Liu B, Eom JS, Huang S, Liu S, Vera Cruz C, Frommer WB, White FF, Yang B (2015) Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J* 82(4): 632–643
  99. Jia H, Xu J, Orbović V, Zhang Y, Wang N (2017) Editing Citrus Genome via SaCas9/sgRNA System. *Front Plant Sci* 8: 2135
  100. Zhang T, Zheng Q, Yi X, An H, Zhao Y, Ma S, Zhou G (2018) Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. *Plant Biotechnol J* 16(8): 1415–1423
  101. Ren J, Zhao Y (2017) Advancing chimeric antigen receptor T cell therapy with CRISPR/Cas9. *Protein Cell* 8(9): 634–643
  102. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, Sasaki N, Boymans S, Cuppen E, van der Ent CK, Nieuwenhuis EE, Beekman JM, Clevers H (2013) Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 13(6): 653–658
  103. Maus MV, Grupp SA, Porter DL, June CH (2014) Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* 123(17): 2625–2635
  104. Choudhary E, Thakur P, Pareek M, Agarwal N (2015) Gene silencing by CRISPR interference in *Mycobacteria*. *Nat Commun* 6: 6267
  105. Singh AK, Carette X, Potluri LP, Sharp JD, Xu R, Priscic S, Husson RN (2016) Investigating essential gene function in *Mycobacterium tuberculosis* using an efficient CRISPR interference system. *Nucleic Acids Res* 44(18): e143
  106. Bakhrebah MA, Nassar MS, Alsuabeyl MS, Zaher WA, Meo SA (2018) CRISPR technology: new paradigm to target the infectious disease pathogens. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22(11): 3448–3452
  107. Park CY, Kim DH, Son JS, Sung JJ, Lee J, Bae S, Kim JH, Kim DW, Kim JS (2015) Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* 17(2): 213–220
  108. Huang L, Holtzinger A, Jagan I, BeGora M, Lohse I, Ngai N, Nostro C, Wang R, Muthuswamy LB, Crawford HC, Arrowsmith C, Kalloger SE, Renouf DJ, Connor AA, Cleary S, Schaeffer DF, Roehrl M, Tsao MS, Gallinger S, Keller G, Muthuswamy SK (2015) Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat Med* 21(11): 1364–1371
  109. Wang J, Exline CM, DeClercq JJ, Llewellyn GN, Hayward SB, Li PW, Shivak DA, Surosky RT, Gregory PD, Holmes MC, Cannon PM (2015) Homology-driven genome editing in hematopoietic stem and progenitor cells using ZFN mRNA and AAV6 donors. *Nat Biotech* 33(12): 1256–1263
  110. Hoban MD, Cost GJ, Mendel MC, Romero Z, Kaufman ML, Joglekar AV, Ho M, Lumaquin D, Gray D, Lill GR, Cooper AR, Urbinati F, Senadheera S, Zhu A, Liu PQ, Paschon DE, Zhang L, Rebar EJ, Wilber A, Wang X, Kohn DB (2015) Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* 125(17): 2597–2604
  111. Azuma H, Paulk N, Ranade A, Dorrell C, Al-Dhalimy M, Ellis E, Strom S, Kay MA, Finegold M, Grompe M (2007) Robust expansion of human hepatocytes in Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup> mice. *Nat Biotech* 25(8): 903–910
  112. Paulk NK, Wurstthorn K, Wang Z, Finegold MJ, Kay MA, Grompe M (2010) Adeno-associated virus gene repair corrects a mouse model of hereditary tyrosinemia in vivo. *Hepatology (Baltimore, Md)* 51(4): 1200–1208
  113. Men K, Duan X, He Z, Yang Y, Yao S, Wei Y (2017) CRISPR/Cas9-mediated correction of human genetic disease. *Sci China Life Sci* 60(5): 447–457
  114. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotech* 31(9): 827–832
  115. Chakrabarti AM, Henser-Brownhill T, Monserrat J, Poetsch AR, Luscombe NM, Scaffidi P (2019) Target-Specific Precision of CRISPR-Mediated Genome Editing. *Molecular cell* 73(4): 699–713 e6
  116. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotech* 31(9): 822–826
  117. Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, Kim JS (2014) Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* 24(1): 132–141
  118. Brunet E, Simsek D, Tomishima M, DeKelver R, Choi VM, Gregory P, Urnov F, Weinstock DM, Jasin M (2009) Chromosomal translocations induced at specified loci in human stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(26): 10620–10625

119. Xiao A, Cheng Z, Kong L, Zhu Z, Lin S, Gao G, Zhang B (2014) Cas9: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(8): 1180–1182

120. Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotech* 32(3): 279–284

121. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M (2015) The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie* 117: 119–128

## CRISPR/Cas as the intelligent immune system of bacteria and archaea

Dalia Blicharska<sup>1</sup>, Izabela Szućko-Kociuba<sup>1,2</sup>, Ewa Filip<sup>1,2</sup>, Lidia Skuza<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup>Institute of Biology, University of Szczecin

<sup>2</sup>Center for Molecular Biology and Biotechnology, Institute of Biology, University of Szczecin

✉corresponding author: lidia.skuza@usz.edu.pl

**Keywords:** CRISPR, Cas9, genetic engineering, off-target

### ABSTRACT

The invention of CRISPR is considered to be one of the most breakthrough discoveries in recent years in the history of biology, biotechnology, medicine, as well as the pharmaceutical and agricultural industries. The methods developed using CRISPR create new, previously unattainable possibilities that can significantly improve the quality of life. From the invention of this intelligent immune system to the present day, much research has been done using the CRISPR/Cas systems. The result of these studies was the development of a modern tool for genetic manipulation, which allows for the introduction of many modifications within the DNA, which may contribute to the silencing of the expression of given genes or their overexpression through e.g. mutations or deletions. The paper describes the application of the method for genetic manipulation with the use of the second class system – CRISPR/Cas9 and the advantages of this method and its advantage over the previously used genetic engineering tools, as well as its limitations and disadvantages, which significantly limit the possibility of its application. The potential use of the method was also presented as well as the research carried out with the use of CRISPR/Cas9.

## CRISPR/Cas jako inteligentny system immunologiczny bakterii i archea

