

# Znamo li UREĐIVATI GENOM?

**Maja SABOL, Zagreb**

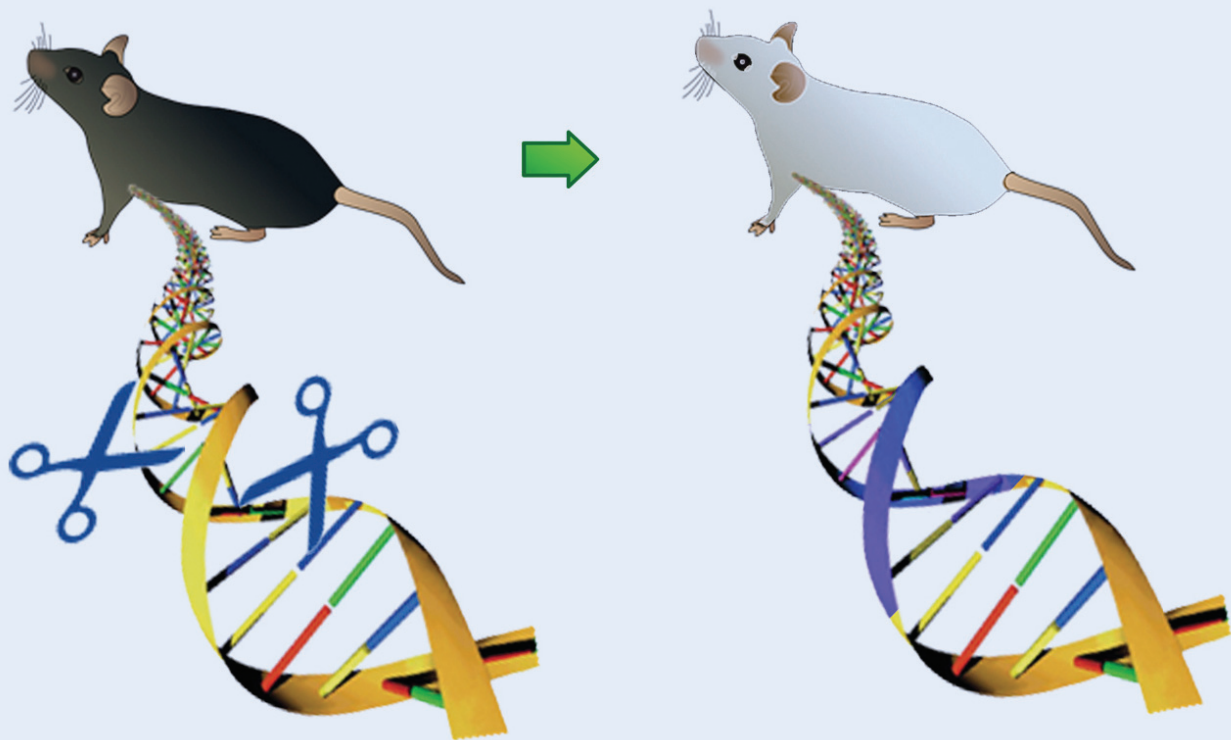
Prošlo je tek nešto više od 60 godina od kada su James Watson, Francis Crick i Rosalind Franklin prvi puta opisali kako izgleda deoksiribonukleinska kiselina (DNA). Biokemijski relativno jednostavna struktura, koja se sastoji od duge šećerne i fosfatne okosnice na koju su vezane četiri različite baze, ima mogućnost pohranjivanja niza informacija koje kontroliraju izgled i funkciju svakog živog bića na Zemlji. Dijelovi DNA koji nose informaciju za sintezu proteina od kojih su naša tijela sastavljena nazivaju se geni. Broj gena razlikuje se između vrsta, ali je stalan i specifičan za svaku vrstu. Između gena nalaze se razne međugenske regije kojima je funkcija tek djelomično poznata. Ukupni slijed DNA nekog organizma naziva se genom. Od otkrića DNA do danas znanstvenici još uvijek neumorno rade na analizama kojima bi ustanovili kakve sve informacije nosi DNA te kako se one manifestiraju u živim bićima. Naime, iako je slijed baza u ljudskom genomu pročitano još 2001. godine, povezivanje tih informacija s njihovom funkcijom nije završeno niti danas.

## Genetičko inženjerstvo

Genetičko inženjerstvo direktna je manipulacija genoma nekog organizma uz pomoć biotehnologije. Genetičkim inženjerstvom sljedovi DNA mogu se ubacivati, izrezivati i mijenjati u postojećoj DNA nekog organizma. Organizam koji nastaje takvom manipulacijom naziva se genetički modificirani organizam (GMO). Genetičko modificiranje organizama ne odnosi se samo na biljke i životinje, koje su najviše u fokusu zbog regulacije prehrambene industrije. Dapače, prvi genetički modificira-

ni organizam bila je bakterija koja je razvijena još 1973. godine. Genetički modificirani organizmi uvelike se koriste i danas, primjerice u proizvodnji inzulina i hormona rasta. Genetički modificirane životinje poput miševa, štakora i riba koriste se za znanstvena istraživanja, dok se neki genetički modificirani usjevi koriste ne samo za prehranu, već i za proizvodnju biogoriva, farmaceutskih proizvoda i sličnih industrijski korisnih proizvoda. Zakonska regulativa genetički modificiranih organizama uvelike se razlikuje od države do države.

Genetičko inženjerstvo složen je niz postupaka te je donedavno izrada genetički modificiranih organizama zahtijevala visoku stručnost i mnogo vremena. Svaki genetički modificirani organizam prolazi niz složenih analiza kojima se utvrđuje točan utjecaj pojedine promjene na organizam. Najlakše su naravno analize najmanje složenih organizama, kao što su virusi i bakterije, te se oni najviše i koriste u znanstvenim istraživanjima. Međutim, ponekad je istraživanja potrebno usmjeriti i na kompleksnije višestanične organizme koji su biološki sličniji čovjeku, kao što su primjerice miševi. Manipulacija genoma miša znatno je složenija nego manipulacija genoma bakterije. Osim toga, uz povećanu kompleksnost u pitanje se dovodi i etička opravdanost izrade i korištenja takvih modela. Naravno, neke oblike istraživanja nužno je provoditi na takvim organizmima, primjerice kada se istražuju procesi koji ne postoje u jednostavnijim modelima kao što su bakterije. Međutim, upravo su istraživanja bakterija dovela do novih revolucionarnih otkrića kojima je omogućeno brzo i jednostavno uređivanje genoma bilo kojeg organizma. Naime, istraživanjem imunološkog sustava bakterija otkriven je niz proteina kojima je uloga specifično prepoznavanje i razgradnja molekula strane DNA s kojima



**Slika 1.** Primjenom CRISPR/Cas9 sustava u biotehnologiji moguće je precizno izrezivanje odsječka DNK. Izrezani odsječak može se zamijeniti drugačijim slijedom DNK. Ovdje je prikazana promjena boja krzna kod miša, ali ova tehnologija više se koristi za popravak oštećenja u genomu koje mogu dovesti do bolesti, ili za uvođenje novih svojstava u organizme koji ih nemaju.

bakterija dođe u kontakt. Analizom tih proteina i njihove funkcije utvrđeno je da je jedan protein, naziva Cas9, odgovoran za specifičnu razgradnju molekule DNA kada ima predložak na temelju kojega može prepoznati točan slijed baza u toj molekuli DNA. Taj predložak se u bakterijama sastoji od odsječka ribonukleinske kiseline (RNA) dugog 20-ak baza, koji nazivamo *spacer RNA*, i dodatne aktivatorske molekule *tracrRNA* (od engl. *trans-activating CRISPR ribonucleic acid*). Ciljeli sustav nazivamo CRISPR/Cas9 (od engl. *clustered, regularly interspaced short palindromic repeats*).

## Tehnologija CRISPR/Cas9

Iste znanstvenice koje su otkrile sustav CRISPR/Cas9, Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier, također su osmislile i pojednostavljeni sustav koji bi se mogao primijeniti u biotehnologiji, a koji obuhvaća samo protein Cas9 i jednu kombiniranu molekulu RNA koju su nazvale *sgRNA* (od engl. *single-guide ribonucleic acid*). Primjenom njihovog sustava omogućeno je precizno izrezivanje ili ubacivanje slijedova DNA u genom, čime se omogućuje uklanjanje ili dodavanje pojedinih funkcija (primjerice popravak oštećenja koje uzrokuje bolest, mogućnost stvaranja novih proteina i slično). Nakon ovih postignuća u 2012. godini, nastala je prava eksplozija istraživanja temeljenih na primjeni CRISPR/Cas9-tehnologije.

Primjenom ovog sustava može se precizno i brzo napraviti uređivanje bilo kojega genoma. Do danas je metoda primijenjena za uzgoj niza genetički modificiranih organizama, od jednostavnih poput vinske mušice i oblića, preko niza biljnih vrsta, do riba, miševa, majmuna, pa čak i ljudskih zametaka. Naravno, takva primjena povlači i niz etičkih pitanja te se za sada drži pod strogom kontrolom. Korištenje ove tehnologije dopušteno je isključivo za istraživačke svrhe, a jedna studija koja je istraživanja radila na ljudskim zametcima bila je strogo kontrolirana i koristila je vrlo rane zametke za koje se znalo da nemaju šansu preživjeti (zbog niza poremećaja u svojem genomu). Sami autori toga istraživanja navode da metodologija još nije dovoljno razvijena da bi se primjenjivala u medicini.

CRISPR/Cas9-tehnologija ima mnoge prednosti u odnosu na pristupe koji su se ranije primjenjivali u genetičkome inženjerstvu. U mnogim slučajevima ugradnja strane DNA rađena je tako da je strana DNA u genom smješтана nasumično – što je za sobom povlačilo niz pitanja o utjecaju te ugradnje na organizam u cjelini. Naime, ugradnja na pogrešnome mjestu mogla bi izazvati neočekivane promjene u funkciji toga genomskeg odsječka i rezultirati neželjenim promjenama. Razvojem metodologije omogućeno je djelomično točno ili čak potpuno točno ciljanje mjesta ugradnje strane DNA, ali ti su postupci bili kompleksni i dugotrajni. CRISPR/Cas9-tehnologija omogućila

je brzo, jednostavno i precizno uređivanje genoma, sa znatno manje nuspojava u odnosu na prijašnje metode. Trenutno veliki broj istraživačkih grupa diljem svijeta pokušava detaljno analizirati i optimizirati CRISPR/Cas9-tehnologiju za još veću specifičnost i sigurnost.

Iako ova tehnologija pruža velike mogućnosti, potrebani su veliki oprez i izuzetno dobra regulacija korištenja ove tehnologije, kao što je primjerice regulirana i tehnologija kloniranja. Zbog toga mnogi znanstvenici koji koriste ovu tehnologiju pozivaju na moratorij primjene CRISPR/Cas9-tehnologije na ljudske zametke, osobito u kliničkoj praksi. Znanstvenici podržavaju temeljna istraživanja, ali upozoravaju na opasnosti korištenja sustava koji još nije dovoljno proučen za bilo kakvu primjenu u ljudima. S druge strane, ukoliko se tehnologija pokaže sigurnom, mogućnosti koje pruža izuzetno su velike. Primjerice, na primjeru miševa već je pokazano da je moguće liječenje pojedinih bolesti čak i u odrasloj jedinki. Ovaj tip liječenja nije primjenjiv za sve tipove bolesti, već je ograničen na bolesti koje nastaju zbog promjena (tzv. mutacija) u jednom ili eventualno malom broju gena. Primjenom ove tehnologije znanstvenici su uspjeli postići popravak mutacije u genu odgovornom za nastanak bolesti kod miša (gen *Fah* odgovoran za nasljednu tirozinemiju\*). Kada su »popravljene« stanice vraćene u miša, došlo je do smanjenja simptoma i oporavka.

## Čija su prava?

U tijeku je i borba oko patentnih prava na ovu tehnologiju, gdje su glavni rivali Jennifer Doudna (University of California, Berkeley) i Emmanuelle Charpentier (Max Planck Institute i Umeå University, Švedska) s jedne strane, te Feng Zhang (Massachusetts Institute of Technology) s druge strane. Doudna i Charpentier patent su prijavile u ožujku 2013. godine, do kada je već objavljeno nekoliko znanstvenih istraživanja na temu CRISPR/Cas9-tehnologije. Feng Zhang je patent prijavio u listopadu 2013. godine po ubrzanom modelu te je njegov patent zahvaljujući tome prvi prihvaćen u 2014. godini. U međuvremenu je Jennifer Doudna prijavila dodatni patent na modificirani oblik tehnologije, koji je također odobren u veljači 2016. godine. Izvorna prijava Doudne i Charpentier još uvijek se obrađuje. Isti istraživači osnovali su i kompanije kojima je konačni cilj primjena ove tehnologije u terapijske svrhe: *Crispr Therapeutics*, *Caribou Biosciences* i *Editas*.

Krajem prošle godine u Washingtonu je održan sastanak pod nazivom *Summit on Human Gene Editing*, na kojem su sudjelovali članovi nacionalnih akademija znanosti Sjedinjenih Ame-

## TKO JE AUTORICA OVOG ČLANKA?

Dr. sc. Maja Sabol zaposlena je u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta »Ruđer Bošković« u grupi dr. sc. Sonje Levanat. Glavni istraživački interes joj je signalni put Hedgehog-Gli u raznim tipovima tumora, ali primarno jajnika i dojke. Tijekom poslijedoktorskog usavršavanja u Institutu za molekularnu genetiku Češke akademije znanosti u Pragu koristila je metodologiju opisanu u ovom članku.

ričkih Država, Velike Britanije i Kine. Raspravljalo se o etici uređivanja genoma, aglavni je zaključak sastanka bio da se uz strogu kontrolu može nastaviti s temeljnim istraživanjima i istraživanjima u svrhu liječenja oboljelih stanica, ali nikako se ne podržava modificiranje spolnih stanica ili embrija, koje bi dovelo do nasljeđivanja unesenih promjena u sljedeće generacije. To bi moglo imati dugoročne posljedice na ljudsku evoluciju u biološkom i društvenom smislu. Zbog toga je u planu izrada regulativa koje bi bile usklađene na svjetskoj razini.

## Literatura:

1. Al-Attar S, Westra ER, van der Oost J, Brouns SJJ. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol Chem* 2011, 392: 277–289.
2. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014, 346(6213): 1258096.
3. Doudna J. Perspective: Embryo editing needs scrutiny. *Nature* 2015, 528(7580): S6.
4. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014, 157(6): 1262–1278.
5. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012, 337(6096): 816–821.
6. Leford H. Bitter fight over CRISPR patent heats up. *Nature* 2016, 529(7586): 265.
7. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Ma W, Zhou C, Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* 2015, 6(5): 363–372.
8. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 2012, 482(7385): 331–338.
9. Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Kotliansky V, Sharp PA, Jacks T, Anderson DG. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol* 2014, 32(6): 551–553.

\* Tirozinemija je urođeni poremećaj metaboličke razgradnje aminokiseline tirozina. Simptomi su poremećaj funkcije jetre i bubrega te intelektualna ograničenost. Ako se ne liječi, poremećaj lako može izazvati smrt.