

Metodologija CRISPR/Cas i njezina primjena u dijagnostici

Sumpor, Danijel

Professional thesis / Završni specijalistički

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:168533>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Danijel Sumpor

METODOLOGIJA CRISPR/Cas I NJEZINA PRIMJENA U DIJAGNOSTICI

Specijalistički rad

Zagreb, 2021.

Poslijediplomski specijalistički studij: Molekularna dijagnostika

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Sanja Dabelić

Specijalistički rad obranjen je dana 29.09.2021.na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pred Povjerenstvom u sastavu:

prof.dr.sc. Karmela Barišić

doc.dr.sc. Sandra Šupraha Goreta

doc.dr.sc. Mario Štefanović

Rad ima 70 listova.

PREDGOVOR

Specijalistički rad izrađen je pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Sanje Dabelić na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ovim putem zahvaljujem mentorici izv.prof.dr.sc. Sanji Dabelić na pomoći pri pisanju, strpljenju i razumijevanju, stručnosti te svim korisnim savjetima za oblikovanje ovog rada.

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju

METODOLOGIJA CRISPR/Cas I NJEZINA PRIMJENA U DIJAGNOSTICI

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je sažeto prikazati primjene metodologije CRISPR/Cas u biomedicini i dijagnostici te dati detaljan pregled trenutno postojećih dijagnostičkih platformi temeljenih na CRISPR/Cas sustavu, kao i dijagnostičkih platformi koje su još u fazi razvoja.

Hipoteze istraživanja su:

1. Metodologija CRISPR/Cas osim široke primjene temeljene na mogućnosti uređivanja genoma ima i velik dijagnostički potencijal.
2. Dijagnostičke platforme temeljene na metodologiji CRISPR/Cas u uznapredovaloj su fazi i izgledno je da će u vrlo bliskoj budućnosti biti u široj uporabi za dijagnostiku zaraznih bolesti.
3. Daljnji razvoj metodologije CRISPR/Cas za dijagnostičke svrhe vjerojatno će dovesti do stvaranja dijagnostičkog alata koji će biti jednako kvalitetna alternativa dijagnostičkoj primjeni lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (*real-time* PCR).

MATERIJAL I METODE

U ovom radu objašnjen je princip funkcioniranja sustava CRISPR/Cas čije je otkriće najprije kao dijela obrambenog sustava prokariota dovelo do razvoja moćnog alata za gensko uređivanje i gensku terapiju te u novije vrijeme kao osjetljive i specifične metodologije za primjenu u dijagnostici. Ovim radom predočena je primjena sustava CRISPR/Cas klase 2 u različitim područjima biomedicine i dijagnostike za koje je karakteristično kidanje ciljnih i kolateralnih molekula DNA i RNA jednim efektorskim proteinom Cas, što je karakteristika koja je omogućila izradu jednostavnih, a pritom visoko osjetljivih i specifičnih platformi za dijagnostiku različitih bolesti, posebno onih koje su uzrokovane virusnim infekcijama. U radu su objašnjene i uspoređene trenutno najrazvijenije platforme temeljene na CRISPR/Cas detekcijskom sustavu II. tipa (CRISPR-Chip), detekcijskom sustavu V. tipa (DETECTR, HOLMES, HOLMESv2, STOPCovid) te detekcijskom sustavu VI. tipa (SHERLOCK, SHERLOCKv2, CARMEN) pri čemu opisane platforme u kombinaciji s drugim metodama poput potenciometrije ili umnažanja nukleinskih kiselina i korištenja različitih tehnika za vizualizaciju rezultata mogu detektirati iznimno niske koncentracije bakterijskih i virusnih patogena (između 10^{-15} M i 10^{-21} M).

REZULTATI

Međusobnom usporedbom mehanizama djelovanja te rezultata osjetljivosti i specifičnosti detekcije DNA i RNA na različitim modelnim organizmima, mogu se uočiti rezultati detekcije iznimno niskih koncentracija ciljnih molekula od interesa te jednostavnost izrade i velik potencijal opisanih platformi za razvoj u dijagnostičke alate za rutinsku primjenu. Niske vrijednosti detekcije ciljnih molekula od 10^{-15} M do 10^{-21} M pokazuju perspektivu za uvođenje opisane metodologije u rutinsku dijagnostiku u bliskoj budućnosti i pružanje kvalitetne alternative metodi *real-time* PCR koja se u molekularnoj dijagnostici uvriježila kao zlatni standard. Neke od opisanih metodologija, poput primjerice metode SHERLOCK, već su

odobrene za rutinsku primjenu u dijagnostici virusa SARS-CoV-2 u jeku borbe protiv aktualne pandemije Covid-19. Predloženo istraživanje pruža izvor informacija za istraživanje i usporedbu drugih dijagnostičkih alata sa sličnom primjenom.

ZAKLJUČCI

Metodologija CRISPR/Cas trenutno prolazi kroz strelovit razvoj u nove dijagnostičke platforme za detekciju ciljnih molekula visoke osjetljivosti i specifičnosti, čijem je razvoju uvelike pridonijela globalna pandemija uzrokovana virusom SARS-CoV-2. Najrazvijenije dijagnostičke metode temeljene na sustavu CRISPR/Cas opisane u ovom radu (CRISPR-Chip, DETECTR, HOLMES, HOLMESv2, STOPCovid, SHERLOCK, SHERLOCKv2 i CARMEN) predstavljaju novu realnost molekularne dijagnostike te u potpunosti pružaju alternativu dijagnostičkom testiranju putem metode *real-time* PCR. Metodologija CRISPR/Cas pogodna je za primjenu u laboratorijima ili dijelovima svijeta s ograničenim resursima te za razvoj prijenosnih dijagnostičkih instrumenata i testova za testiranje na mjestu pružanja zdravstvene skrbi (engl. *point-of-care testing*). Identifikacijom novih ortologa proteina Cas koji pokazuju poboljšana svojstva u odnosu na poznate i već korištene proteine Cas u sustavima CRISPR/Cas otvorit će put ka razvoju novih dijagnostičkih platformi temeljenih na ovoj revolucionarnoj metodologiji, čiju ćemo upotrebu moći sve češće vidjeti u kliničkoj upotrebi u bliskoj budućnosti.

SUMMARY

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Department of Biochemistry and Molecular Biology

CRISPR/Cas METHODOLOGY AND ITS APPLICATION IN DIAGNOSTICS

OBJECTIVES

The aim of the research is to briefly present the CRISPR/Cas methodology and its application in biomedicine and diagnostics and to give a detailed overview of the currently existing diagnostic platforms based on the CRISPR/Cas system, as well as other diagnostic platforms that are still in the phase of development.

The research hypotheses are:

1. The CRISPR/Cas methodology, in addition to its wide application based on the possibility of genome editing, also has a great potential as a diagnostic tool.
2. Diagnostic platforms based on the CRISPR/Cas methodology are at an advanced stage and are likely to be widely used for the diagnosis of infectious diseases in the very near future.
3. Further development of the CRISPR/Cas methodology in diagnostics is likely to lead to the creation of a diagnostic tool that will be an equally high-quality alternative to the diagnostic application of real-time polymerase chain reaction (*real-time* PCR).

MATERIALS AND METHODS

This paper explains the principles of the CRISPR/Cas system, which was first discovered as part of the prokaryotic defense system, whose discovery led to the development of a powerful tool for gene editing and gene therapy and more recently as sensitive and specific methodology for diagnostic applications. This paper presents application of the CRISPR/Cas class 2 system in various fields of biomedicine and diagnostics, which is characterized by cleavage and detection of target DNA and RNA molecules by a single Cas effector protein, which presents a feature that allowed the creation of simple yet highly sensitive and specific platforms for the diagnosis of various diseases, especially those caused by viral infections. Different CRISPR/Cas platforms based on type II (CRISPR-Chip), type V (DETECTR, HOLMES, HOLMESv2, STOPCovid) and type VI (SHERLOCK, SHERLOCKv2, CARMEN) detection systems are described, explained and compared. These platforms can detect extremely low concentrations of bacterial and viral pathogens (lower than 10^{-15} M) and in combination with other methods such as potentiometry or nucleic acid amplification and the use of different result visualization techniques can serve as diagnostic tools of high sensitivity and specificity.

RESULTS

By comparing the mechanisms of action and the results of sensitivity and specificity of DNA and RNA detection in different model organisms, results are showing detection at extremely low concentrations of target molecules, ease of development and great potential of described platforms for development into diagnostic tools for routine use. Low detection values of target molecules from 10^{-15} M to 10^{-21} M show the prospect of introducing the described methodology in routine diagnostics in the near future and providing an alternative to the *real-time* PCR which has become the golden standard in molecular diagnostic testing. Some of the described methodologies, such as the SHERLOCK method, have already been approved for

routine use in the diagnostics of SARS-CoV-2 virus in the midst of the battle against the current Covid-19 pandemic. The proposed research provides a source of information for research and comparison of other diagnostic tools with similar application.

CONCLUSIONS

The CRISPR/Cas methodology is currently undergoing rapid development into new diagnostic platforms for the detection of target molecules of high sensitivity and specificity, the development of which has been greatly contributed by the global pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus. The most developed diagnostic methods based on the CRISPR/Cas system described in this paper (CRISPR-Chip, DETECTR, HOLMES, HOLMESv2, STOPCovid, SHERLOCK, SHERLOCKv2 and CARMEN) represent a new reality of molecular diagnostics and provide a promising alternative to the *real-time* PCR diagnostic testing. The CRISPR/Cas methodology is suitable for application in laboratories or parts of the world with limited resources and for the development of portable diagnostic instruments and tests for *point-of-care* testing. The identification of the new Cas protein orthologs which possess improved properties over known and already used Cas proteins in CRISPR/Cas systems will pave the way for the development of new diagnostic platforms based on this revolutionary methodology, the use of which we will increasingly see in clinical use in the near future.

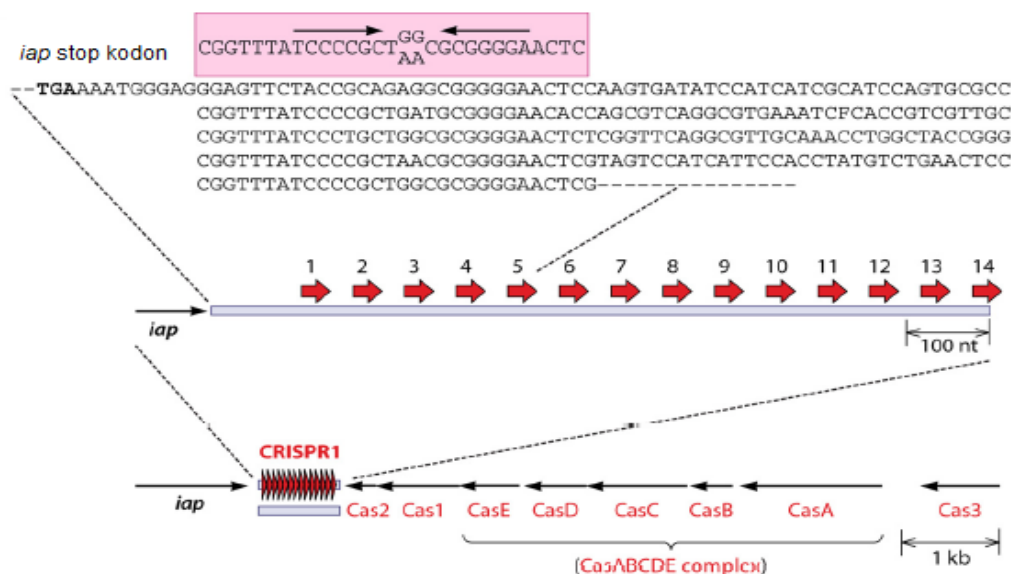
Sadržaj

1. Uvod i pregled područja istraživanja	1
1.1. Mehanizam djelovanja sustava CRISPR/Cas kao obrambenog sustava prokariota	2
1.2. Klasifikacija i opća svojstva sustava CRISPR/Cas	5
1.2.1. Biokemijska svojstva sustava II. tipa.....	9
1.2.2. Biokemijska svojstva sustava V. tipa	10
1.2.3. Biokemijska svojstva sustava VI. tipa	12
1.3. Sustav CRISPR/Cas u molekularnoj biologiji	13
1.3.1. Povijesni pregled ključnih otkrića i mehanizam djelovanja sustava CRISPR/Cas kao molekularno-biološkog alata	13
1.3.2. Primjena sustava CRISPR/Cas u ne-medicinskim područjima ljudske djelatnosti.....	15
1.3.3. Primjena sustava CRISPR/Cas u biomedicini	16
1.3.4. Primjena sustava CRISPR/Cas u dijagnostici.....	17
2. Cilj istraživanja	20
3. Materijal i metode – sustavni pregled saznanja o temi	21
3.1. CRISPR detekcijski sustavi II. tipa	22
3.1.1. CRISPR-Chip	22
3.2. CRISPR detekcijski sustavi III. tipa	25
3.2.1. DETECTR	25
3.2.2. HOLMES	28
3.2.3. HOLMES v2	29
3.2.4. STOPCovid	31
3.3. CRISPR detekcijski sustavi VI. tipa	33
3.3.1. SHERLOCK	33
3.3.2. SHERLOCKv2	35
3.3.3. CARMEN	36
4. Rasprava	39
5. Zaključci	45
6. Literatura	46
7. Životopis	52

1. Uvod i pregled područja istraživanja

1. Uvod i pregled područja istraživanja

CRISPR/Cas sustav prilagodljivi je imunološki mehanizam prisutan u mnogim bakterijama i većini arheobakterija (1). Prema dosadašnjim istraživanjima, sustavi CRISPR/Cas nalaze se u oko 45% bakterijskih i u oko 87% arheobakterijskih genoma (2–4). Glavna značajka CRISPR/Cas sustava je da su sastavljeni od naizmjeničnih identičnih ponavljanja odnosno palindroma i jedinstvenih razmaknica to jest „spacera“ po čemu su dobili ime (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), a prvotno su otkriveni 1987. godine u bakteriji *Escherichia coli* K12 (5, 6). Sekvence razmaknica, odnosno u daljnjem tekstu spacera pokazuju podudaranje sa sekvencama bakteriofaga i plazmida što ukazuje na njihovo podrijetlo i ugradnju u CRISPR lokus kao posljedicu bioloških aktivnosti kao što su bakterijska konjugacija ili razne virusne infekcije te upućuju na to da se CRISPR/Cas sustav razvio kao obrambeni sustav prokariota (7,8). Odmah do CRISPR lokusa nalazi se niz gena koji kodiraju proteine Cas (engl. *CRISPR-associated proteins*) koji su uključeni u tri faze bakterijske obrane od strane DNA: faze adaptacije, faze sinteze i sazrijevanja crRNA (CRISPR RNA) i faze interferencije (9). Slika 1 grafički prikazuje položaj CRISPR ponavljanja u odnosu na lokuse za proteine Cas.



Slika 1. Prvi CRISPR pronađen u *E. coli* kao rezultat analize gena *iap* iz *E. coli*, klaster gena *cas* također je identificiran u nizvodnoj regiji. Preuzeto i obrađeno iz rada (6).

Metodologija temeljena na CRISPR/Cas sustavu, koja omogućava precizno uređivanje eukariotskih genoma, revolucionalizirala je molekularnu biologiju, na način da se njihova uporaba ne ograničava isključivo na uređivanje genoma već tehnologija temeljena na CRISPR/Cas pruža mogućnost detekcije prisutnosti stranih molekula nukleinskih kiselina u organizmu, primjerice bakterijskih ili virusnih, čime uz moćan terapijski potencijal ima i veliki dijagnostički potencijal (10). Upravo je globalna borba protiv pandemije virusa SARS-CoV-19 kojoj trenutno svjedočimo uvelike pridonijela ubrzanom razvoju metodologije CRISPR/Cas u dijagnostičke svrhe, i prvi takvi dijagnostički kompleti već su odobreni za uporabu u određenim zemljama (11).

1.1. Mehanizam djelovanja sustava CRISPR/Cas kao obrambenog sustava prokariota

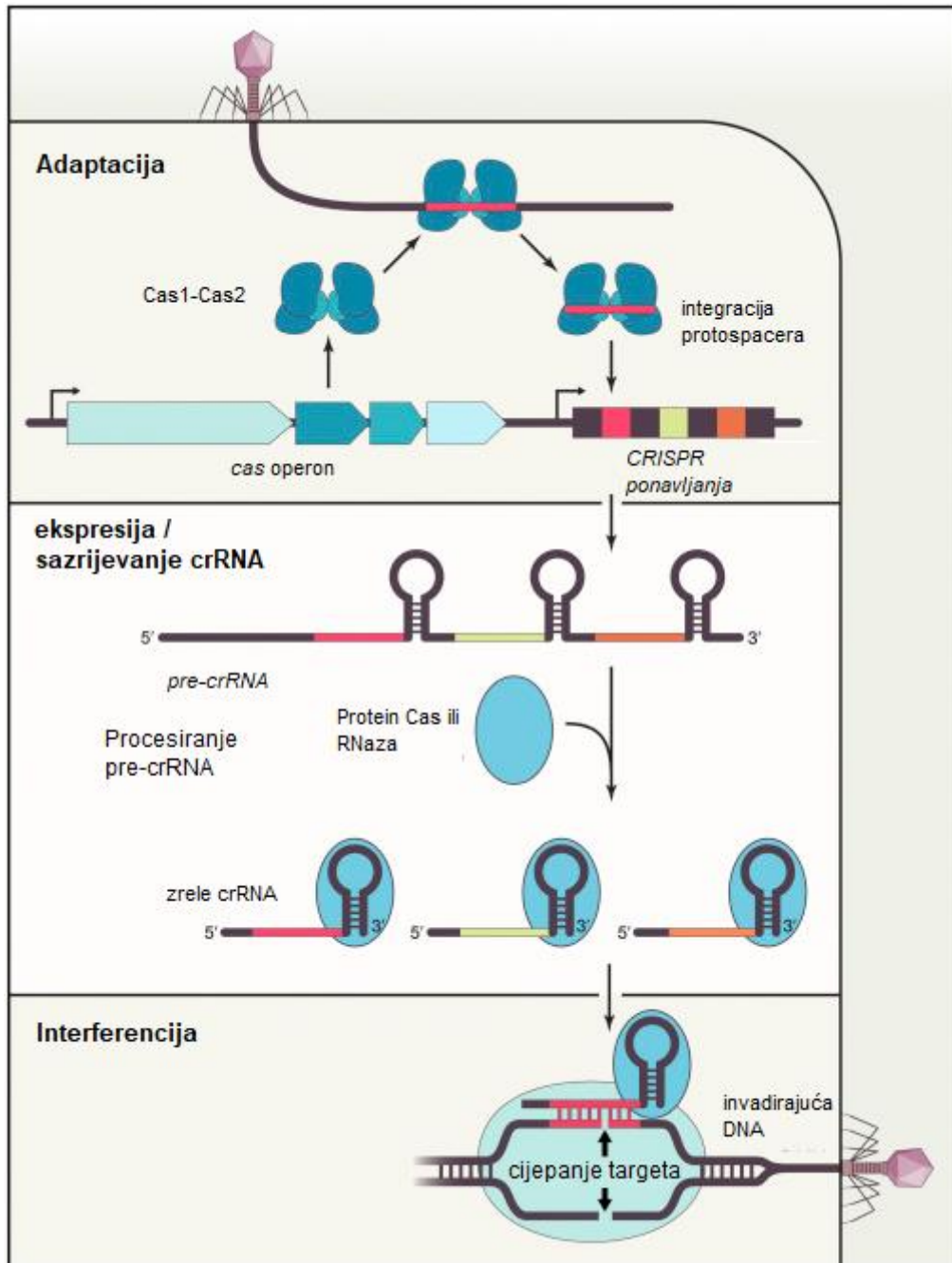
Način na koji bakterije i arheobakterije stvaraju otpornost na virusne infekcije pomoću CRISPR sustava temelji se činjenici da ih mogu inficirati defektne varijante bakteriofaga ili divlji tipovi bakteriofaga koji se na neki drugi obrambeni način (tj. ne CRISPR-posredovanim načinom) mogu inaktivirati u stanici domaćinu. Defektne varijante bakteriofaga postoje u prirodi i mogu injektirati svoj genom u stanicu domaćina no nisu sposobne završiti svoj životni ciklus, ili su u tome prespore. Kada stanica domaćina preživi prvi virusni napad (jer je bakteriofag defektan ili se uspjela obraniti ne-CRISPR-posredovanim mehanizmom), dio genoma bakteriofaga može se inkorporirati unutar specifičnog lokusa CRISPR, koji se sastoji od kratkih ponavljanja DNA, veličine 23-55 baznih parova (bp). Taj dio genoma bakteriofaga tada nazivamo CRISPR DNA spacer, a veličine je 21 do 72 bp (7). Lokusi CRISPR postoje na više mjesta (čak do 23) u bakterijskom genomu i mogu sadržavati veći broj spacera (čak do 600). Spomenuti proces poznat je kao prva faza obrane odnosno faza adaptacije ili faza akvizicije (12).

Tijekom tog procesa dolazi do međusobne interakcije proteina prve faze koji započinju identifikaciju strane DNA. Proteini prve faze su dvije visoko očuvane nukleaze Cas1 i Cas2

koje tvore stabilan kompleks s dva Cas1 dimera povezana jednim Cas2 dimerom (13). Oba proteina prisutna su u svim funkcionalnim CRISPR/Cas sustavima i potrebna za integraciju spacera. Kada je bakterija ili arheja napadnuta bakteriofagom, kompleks proteina Cas1 i Cas2 zajedno će s ostalim Cas proteinima izrezati fragment invadirajuće nukleinske kiseline kojeg još nazivamo i protospacer a on će se potom ugraditi u CRISPR lokus domaćina kao spacer između ponavljajućih sekvenci. Ovisno o tipu CRISPR sustava, prepoznavanje protospacera može ovisiti i o specifičnim sekvencama koje se nalaze na stranoj DNA, kao što je to primjerice sekvenca PAM (engl. *proto-spacer adjacent motif*) (13).

Ukoliko je bakterija ponovno napadnuta istim tipom virusa, odvija se druga faza koju nazivamo faza ekspresije. Tada dolazi do ekspresije ostalih Cas proteina, a s CRISPR lokusa se spaceri prepisuju u jednu dugačku RNA, odnosno jedan dugački primarni CRISPR transkript koji nazivamo pre-crRNA. Da bi započeo antiviralnu obranu, kompleks CRISPR/Cas formirat će se u takozvani kaskadni kompleks (engl. *Cascade*) koji se veže na pre-crRNA i omogućava njeno cijepanje u zrele crRNA. Kod sustava II. tipa u ovoj se fazi pojavljuje još jedna vrsta RNA molekule koja se veže na transkribiranu pre-crRNA. Ta RNA je nekodirajuća i naziva se trans-aktivirajuća CRISPR RNA odnosno tracrRNA. Molekula tracrRNA hibridizira se sa crRNA ponavljajućom sekvencom na pre-crRNA te je njeno postojanje nužno za procesiranje pre-crRNA, vezanje proteina Cas9 koji je endonukleaza i njegovo posredovano cijepanje pre-crRNA u zrele crRNA. Zrela crRNA zajedno sa tracrRNA i proteinom Cas9 djeluje poput „tragača“ koji prepoznaje i napada invadirajuću nukleinsku kiselinu pomoću sekvence spacera koja je sastavni dio crRNA. Ukoliko sekvenca crRNA ima homologiju sa sekvencom invadirajućeg virusa, protein Cas9 pocjepat će virusnu DNA i na taj način omogućiti bakterijskoj stanici da preživi (13). Tu fazu, tijekom koje dolazi do prepoznavanja ciljne molekule invadirajuće DNA ili RNA od strane Cas9 ili drugih Cas proteina uz vođenje crRNA i konačnog cijepanja genoma napadajućeg entiteta, čime se stanice domaćina štite od infekcija i u konačnici umiranja, nazivamo fazom interferencije. Ukratko možemo reći da se cijeli princip djelovanja CRISPR/Cas sustava kao obrambenog sustava temelji na međusobnom djelovanju proteina Cas i zrele CRISPR RNA (crRNA) koji zajedno tvore ribonukleoproteinski kompleks

(engl. *ribonucleoprotein complex*, RNP), a on prepoznaje stranu DNA uparivanjem baza crRNA i ciljnih nukleinskih kiselina te je odstranjuje (13,14,15). Grafički prikaz mehanizma djelovanja sustava CRISPR/Cas nalazi se na slici 2.



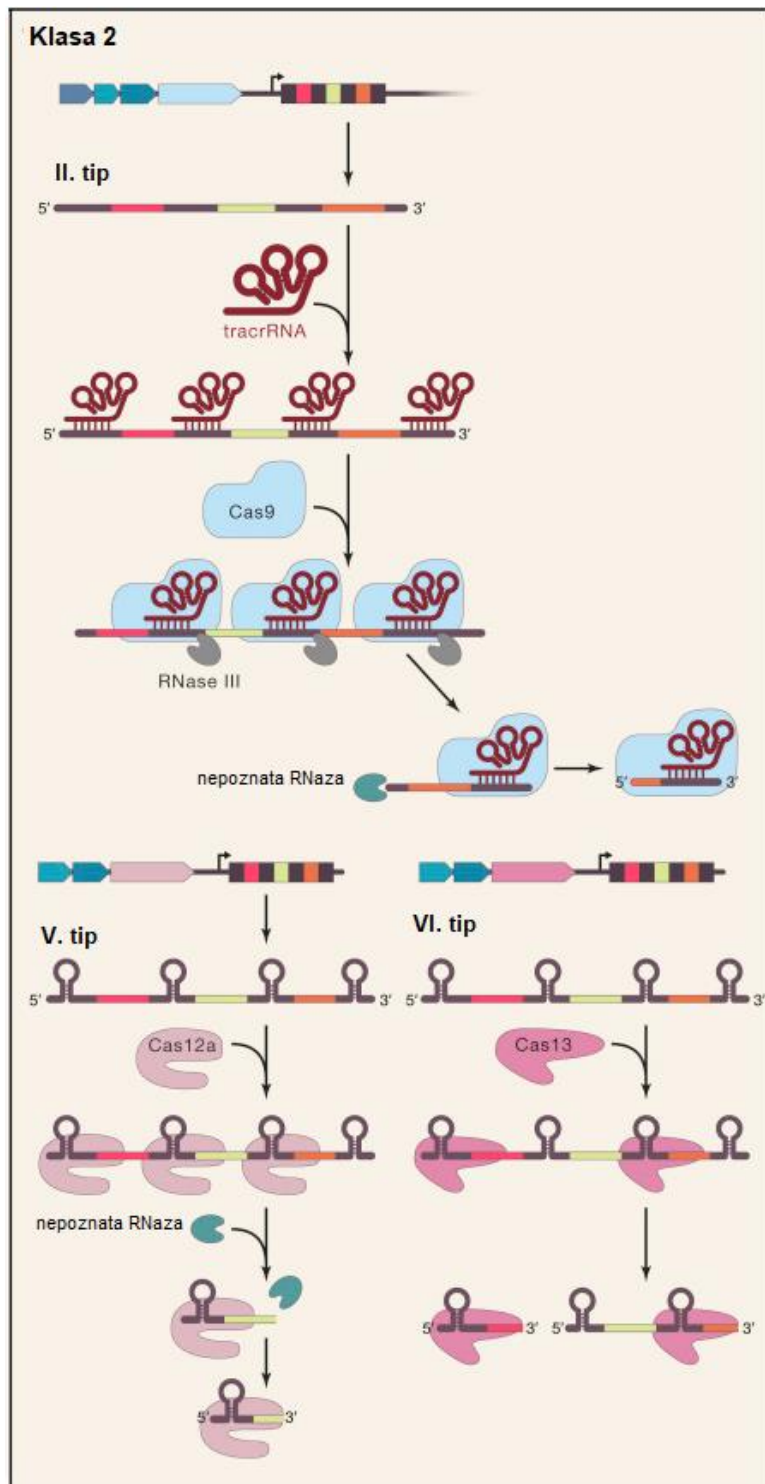
Slika 2. Grafički prikaz tri faze CRISPR/Cas mehanizma. U fazi adaptacije prepoznaje se strana DNA i ugrađuje u CRISPR lokus pomoću proteina Cas1 i Cas2. U drugoj fazi se odvija ekspresija s CRISPR/Cas lokusa i obrada pre-crRNA u zrele crRNA uz djelovanje proteina Cas ili staničnih RNaza. U trećoj fazi dolazi do interferencije, odnosno formiranja kompleksa crRNA i proteina Cas koji kidaju invadirajuće DNA. Preuzeto i obrađeno iz rada (15).

1.2. Klasifikacija i opća svojstva sustava CRISPR/Cas

Slično ostalim mehanizmima obrane u biološkim sustavima, sustavi CRISPR-Cas evoluirali su u kontekstu neprestane utrke naoružanja s mobilnim genetičkim elementima, što je rezultiralo širokom diverzifikacijom sljedova proteina Cas i u samoj arhitekturi lokusa CRISPR-Cas. Svi CRISPR/Cas sustavi doduše međusobno dijele osnovne karakteristike koji ukazuju na njihovo zajedničko evolucijsko podrijetlo (9,14). Uvriježeno je mišljenje da se primarni oblik mehanizma CRISPR/Cas obrane razvio u pretku arheobakterija te horizontalno proširio na domenu bakterija (15). Proteini Cas razlikuju se međusobno po strukturi svojih ciljnih nukleinskih kiselina (DNA ili RNA, jednolančane ili dvolančane, linearne ili kružne DNA, druge strukturne osobine), tipu reza (ljepljivi ili tupi krajevi) i načinu djelovanja. Prisutni su u svim fazama CRISPR mehanizma te ispoljavaju brojne funkcije za obradu nukleinskih kiselina, poput nukleazne, helikazne ili polimerazne aktivnosti. Većina proteina Cas može se grupirati u dva glavna funkcionalna modula: adaptacijski modul koji strani genetički materijal isporučuje u CRISPR lokuse za stvaranje crRNA i efektorski modul koji, vođen molekulom crRNA, cilja i cijepa invazivne nukleinske kiseline (9,13). Ove karakteristike Cas proteina omogućile su podjelu CRISPR/Cas sustava u dvije klase, koje su dalje podijeljene u šest tipova i nekoliko podtipova. U prvu klasu CRISPR/Cas ubrajamo one sustave koji za uništavanje DNA koriste više od jednog proteina Cas, dok u drugu klasu ubrajamo one koji koriste samo jedan, veći, protein Cas. Prema najnovijoj klasifikaciji, prva klasa CRISPR/Cas sustava može se podijeliti na sustave I., III. i IV. tipa, dok se CRISPR/Cas sustavi druge klase dijele na sustave II., V. i VI. tipa. Nova klasifikacija iz 2020. godine ukupno uključuje podjelu CRISPR/Cas sustava na 2 klase, 6 tipova i 33 podtipa (16). Zanimljivo je da su sustavi II. tipa, koji su prvi korišteni u svrhe genetičke manipulacije najrjeđi, u potpunosti nedostaju u arheobakterijama i zastupljeni su u samo oko 5% genoma patogenih bakterija (17).

Obilježje CRISPR/Cas obrane je korištenje molekule crRNA za ciljanje specifičnih sekvenci invazivnih genetičkih elemenata. U sustavima klase 1, CRISPR lokus se transkribira

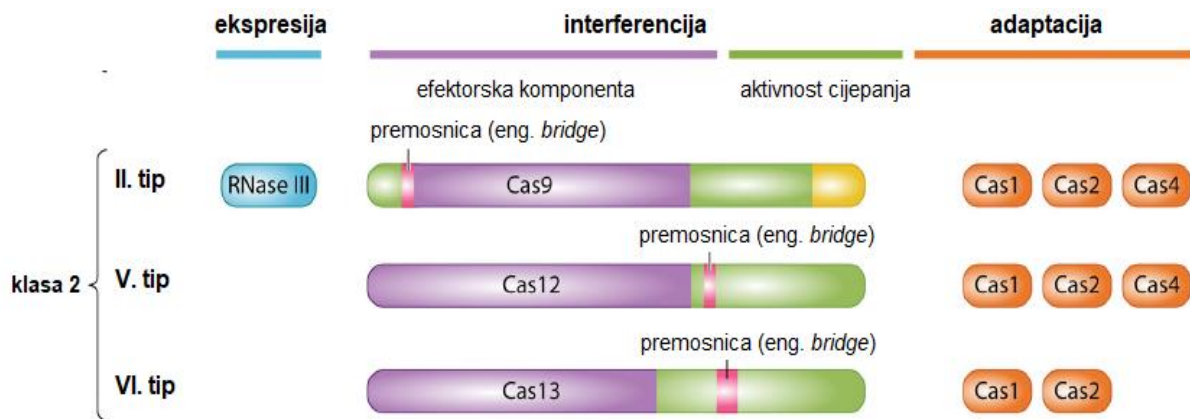
u jednu dugačku pre-crRNA kod koje proteini Cas6 prepoznaju strukturu ponavljanja i sekvencu transkripta i obrađuju pre-crRNA u intermedijere ili zrele crRNA. Sazrijevanje crRNA u sustavima klase 2 značajno se razlikuje. U II. tipu sustava, molekule tracrRNA i pre-crRNA stvaraju duplekse, koje protein Cas9 veže i stabilizira. Ovo vezanje omogućuje aktivaciju proteina domaćina RNaze III i obradu transkripta u zrele crRNA, međutim opisani su i sustavi II. tipa koji koriste put neovisan o RNazi III (18,19). U sustavima V. i VI. tipa proteini Cas12 i proteini Cas13 posjeduju dvostruku nukleaznu aktivnost; jednu za crRNA procesiranje i drugu za obavljanje faze interferencije. Većina podtipova sustava tipa V i VI. ne zahtijeva prisutnost molekule tracrRNA kako bi prepoznala pre-crRNA, već se prepoznavanje strukture i ponavljanja te cijepanje pre-crRNA odvija pomoću proteina Cas12 i Cas13 (20). Sazrijevanje crRNA u sustavima II., V., i VI. tipa sažeto je grafički prikazano na slici 3.



Slika 3. Sažeti grafički prikaz sazrijevanja crRNA u sustavima II., V., i VI. tipa. U sustavima II. tipa doći će do stvaranja dupleksa tracrRNA i crRNA na koji će se vezati protein Cas9 i aktivirati cijepanje posredovano RNazama u zrele crRNA. Kod sustava V. i VI. tipa vezanje pre-crRNA i obrada u zrele crRNA omogućeno je samim proteinima Cas12 i Cas13 koji posjeduju i RNaznu aktivnost. Preuzeto i obrađeno iz rada (15).

Kao što je već spomenuto, sustave klase 2 CRISPR/Cas možemo podijeliti na sustave II., V. i VI. tipa. Karakteristična značajka ovih tipova je da se njihovi efektorski kompleksi sastoje od jednog, velikog, multidomenskog proteina, kao što je to primjerice protein Cas9 u sustavima II. tipa (21). Bioinformatička pretraga brojnih bakterijskih i arheobakterijskih genoma koristila se visoko očuvanom sekvencom gena *cas1* te CRISPR ponavljanjima kao uporištima koja u svojoj blizini imaju sekvencu koja kodira veliki protein, potencijalni efektorski protein sustava klase 2. Znanstvenici su ovim putem identificirali 53 lokusa kandidata s karakteristikama efektorskih proteina koje odgovaraju CRISPR/Cas sustavima klase 2, a koji prethodno nisu bili svrstani u do tada poznata 3 različita tipa. Novo identificirani lokusi nazvani su C2c1 (engl. *Class 2 candidate 1*), C2c2 (engl. *Class 2 candidate 2*) i C2c3 (engl. *Class 2 candidate 3*). Zahvaljujući takvoj usmjerenoj bioinformatičkoj potrazi za drugim efektorskim proteinima klase 2 potvrđeno je postojanje novih proteina Cas čija nova otkrića uključuju višestruke, raznolike varijante sustava V. tipa te varijante sustava VI. tipa koji su prvi puta do sada pokazali jedinstvenost CRISPR/Cas sustava da isključivo cijepaju molekule RNA (14,19).

Sustavi V. tipa bitno se razlikuju od sustava II. tipa biokemijskom strukturom i položajem domena u svojim efektorskim proteinima. Efektorski proteini II. tipa, kao što je to protein Cas9, sadrže RuvC i HNH nukleazne domene koje su odgovorne za cijepanje jednog lanca ciljne DNA. Suprotno tome, efektorski proteini V. tipa, kao što je to primjerice protein Cas12, sadrže samo domenu nalik RuvC koja cijepa oba lanca, a posjeduju i aktivnost RNaze (22,23). Efektorski proteini VI. tipa, kao što je to protein Cas13, nisu povezani s efektorima sustava II. i V. tipa budući da sadrže dvije domene HEPN i ciljaju isključivo transkripte invazivnih DNA genoma. Proteini Cas13 također pokazuju još jednu dodatnu karakteristiku, a to je kolateralna i nespecifična aktivnost RNaze koja nastupa nakon prepoznavanja i cijepanja ciljne RNA, a pretpostavlja se da kao rezultat uzrokuje mirovanje bakterija zaraženih virusom (24). Grafički prikaz razlika u građi efektorskih proteina sustava CRISPR/Cas klase 2 ilustriran je na slici 4.



Slika 4. Grafički prikaz podjele efektorskih proteina sustava klase 2 s prikazom katalitičkih domena koje vrše cijepanje. Prikazani su i ostali proteini Cas koji sudjeluju u fazi adaptacije. Preuzeto i obrađeno iz rada (6).

1.2.1. Biokemijska svojstva sustava II. tipa

Unutar klase 2 CRISPR/Cas sustava, najbolje istražena skupina je II. tip sustava, u kojem nalazimo poznati efektorski protein Cas9. Protein Cas9 je po svojoj biokemijskoj funkciji RNA-vođena DNA endonukleaza te u najčešće istraženim varijantama ima masu od 163 kilodaltona i izgrađen je od 1368 aminokiselina. Cas9 je protein koji zahtijeva interakciju s dvije različite molekule RNA kako bi se dobio dvolančani lom s tupim krajevima u ciljnoj molekuli DNA. Te molekule RNA su crRNA i tracrRNA, koje zajedno s Cas9 vode napad na stranu DNA (19).

Analiza kristalne strukture proteina Cas9 pokazala je kako se protein sastoji od 2 režnja (engl. *lobes*), od kojih jedan služi kao mjesto za prepoznavanje pa ga nazivamo režanj REC (od engl. *recognition*) i drugog koji djeluje kao nukleaza pa ga shodno tome nazivamo režanj NUC (od engl. *nuclease*) (25). Režanj NUC u sebi sadrži domenu PI (engl. *PAM interacting*) koja je odgovorna za prepoznavanje sekvence PAM. Sekvenca PAM nalazi se na invadirajućoj DNA, a može biti dugačka 2 do 8 baznih parova, pri čemu njezin točan slijed i duljina ovise o tome o kojoj se vrsti bakterija radi. Nalazi se na 5' kraju protospacera na lancu DNA koji nije

ciljni, odnosno 2 do 8 nukleotida dalje od 3'-kraja ciljnog DNA slijeda. Konsenzus sekvenca za PAM jest 5'-NGG-3' gdje slovo N označava bilo koju bazu iza koje slijede dva gvanina. Bez postojanja sekvence PAM lako bi došlo do pogreške i cijepanja molekule DNA samog domaćina. Budući da su virusna DNA i sekvenca spacera u CRISPR lokusu identične, mora postojati specifičan slijed nukleotida koji slijedi nakon protospacera i spacera koji će sustavu CRISPR/Cas omogućiti da razlikuje virusnu DNA od spacera u CRISPR lokusu domaćina. PAM je sekvenca koju protein Cas9 pretražuje prije nego što provjeri homologiju virusne DNA s molekulom crRNA. Sekvence spacera u CRISPR lokusu završavaju slijedom 5'-GTT-3', što ih čini nepodložnima samocijepanju proteinom Cas9. Sekvenca PAM osim što pomaže razlikovati stranu DNA od DNA domaćina, ubrzava sam proces i vrijeme pretraživanja strane invadirajuće DNA (21). Uz domenu PI, režanj NUC proteina Cas9 sadrži još dvije nukleazne domene nazvane RuvC i HNH. Domena RuvC cijepa ciljni lanac nekomplementarne DNA uz prisutnost Mg^{2+} iona, dok domena HNH cijepa komplementarni lanac DNA. Režanj REC odgovoran je za prepoznavanje palindromskih ponavljanja u CRISPR lokusu, a sastoji se od domena REC1 i REC2. Negativno nabijeni heterodupleks sačinjen od crRNA i ciljane DNA smješta se u pozitivno nabijenom utoru između reznjeva REC i NUC. Strukturna analiza CRISPR/Cas9 kompleksa s ciljanom DNA pokazala je da se nakon vezanja Cas9 događa strukturno izobličenje uzvojnice DNA čime se stvara takozvana R-petlja, što zatim uzrokuje promjenu konformacije u Cas9, tako da se katalitička mjesta domena RuvC i HNH smještaju u neposrednu blizinu pomaknutih i ciljanih lanaca (26).

1.2.2. Biokemijska svojstva sustava V. tipa

CRISPR/Cas sustavi V. tipa dijele jedno zajedničko svojstvo sa sustavima II. tipa, a to je prisutnost endonukleazne domene slične RuvC. Međutim, ostali dijelovi proteina iz sustava II i V. tipa poput proteina Cas9 i Cas12 (nova oznaka za efektore V. tipa) i različitih podtipova ne pokazuju međusobnu sličnost na razini sekvenci ili strukture. Proteini Cas12 veličinom su

nešto manji od proteina Cas 9 te su građeni od oko 1300 aminokiselina. Efektorski proteini Cas12 (prvotno poznati kao Cpf1) ne trebaju prisutnost molekule tracrRNA, a osim što cijepaju DNA putem svoje RuvC domene, posjeduju aktivnost RNaze, što im omogućuje obradu vlastitih i ciljnih RNA. Također, protein Cas12 prepoznaje drugačiji PAM slijed, koji posjeduje konsenzus sekvencu 5'-TTTN-3', gdje slovo N predstavlja bilo koju bazu (27). Za razliku od sustava II. tipa, koji koriste različite sekvence PAM smještene na nekodirajućem lancu, proteini Cas12 prepoznaju PAM na oba lanca DNA, s time da je sekvenca PAM na nekodirajućoj molekuli DNA mora biti bogata timinom (20).

Analiza kristalne strukture pokazala je sličnu arhitekturu kao i kod proteina Cas 9 te se protein Cas12 također sastoji od dva režnja, isto kao i kod Cas9 nazvanih REC i NUC. Režanj REC koji se nalazi na N-kraju, ima ulogu u raspoznavanju ciljne molekule i sastoji se od domena REC1 i REC2 koje su povezane domenom WED za režanj NUC na C-kraju, koji sadrži domene PI, RuvC i Nuc. Protein Cas12 zahtijeva vođenje do ciljne molekule pomoću molekule crRNA koja je obično dugačka 42-44 nukleotida (28,29). Molekula crRNA prepoznaje se preko specifičnih interakcija pri čemu protein Cas12 prepoznaje palindromski slijed u crRNA, nakon čega kompleks Cas12-crRNA također kreće u pretraživanje sekvence PAM čime se katalizira cijepanje strane DNA. Za razliku od proteina Cas9 koji nakon cijepanja DNA prelazi u enzimski neaktivno stanje, protein Cas12 ostaje u enzimski aktivnom stanju i pokazuje aktivnost kolateralnog cijepanja DNA. U načelu se nakon cijepanja ciljne DNA događa da dio pocijepane DNA u blizini sekvence PAM ostaje vezan za Cas12-crRNA kompleks, što protein Cas12 ostavlja u katalitički aktivnom stanju i omogućuje mu degradaciju susjednih ne-ciljnih jednolančanih DNA (28) Shodno tome možemo reći da protein Cas12 nakon cijepanja ciljne DNA prelazi iz *cis* stanja u *trans* stanje tijekom kojeg se događa cijepanje ne-ciljnih jednolančanih DNA. Promjena i ostanak proteina Cas12 u aktivnom trans-cjepajućem stanju posredovano je hibridizacijom crRNA s nekodirajućom DNA (30).

1.2.3. Biokemijska svojstva sustava VI. tipa

CRISPR/Cas sustavi VI. tipa kodiraju jedan efektorski protein Cas13 (poznat još i kao C2c2) koji za razliku od ostalih DNA - kidajućih Cas proteina može cijepati ciljnu jednolančanu RNA te ciljna RNA koja je komplementarna sa crRNA može aktivirati Cas13 za razgradnju kolateralnih nespecifičnih jednolančanih RNA. Protein Cas13 po svojoj biokemijskoj funkciji je RNA-vođena RNA endonukleaza te je strukturom od oko 1400 aminokiselina nešto veći i teži od ostalih efektorskih proteina CRISPR/Cas sustava klase 2. Sustavi VI. tipa u svojoj strukturi sadrže dvije domene HEPN (engl. *higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide – binding domains*) koje obično pronalazimo u RNazama (19,31). Protein Cas13 aktivira se ciljnim jednolančanim RNA molekulama komplementarnim s crRNA te prisutnost molekule tracrRNA nije potrebna (32,33). Proteini Cas13 koriste 64 nukleotida dugačku vodeću crRNA koja ih vodi ka specifičnom cilju. Nakon što Cas13 prepozna i cijepa svoju ciljnu RNA sekvencu kako je specificirano sekvencom crRNA, on usvaja enzimski aktivno stanje, umjesto da se vrati u neaktivno stanje kao što je to slučaj kod Cas9. Kao rezultat toga, Cas13 će tada vezati i cijepati bilo koje obližnje RNA bez obzira na homologiju s crRNA ili prisutnost specifičnog vezujućeg motiva za VI. tip sustava na ciljnoj molekuli kojeg nazivamo PFS (engl. *protospacer flanking site*) (32). To je u potpunoj suprotnosti s Cas9, koji zahtijeva da svaka ciljna DNA ima visoki identitet sekvence u razmaku i sadrži odgovarajuću PAM sekvencu. Pri vezanju crRNA protein Cas13 prolazi kroz konformacijsku promjenu koja katalitičke domene HEPN dovodi u neposrednu blizinu ciljne RNA. Domena HEPN se u aktivnom stanju enzima nalazi se na njegovoj vanjskoj površini čime se pogoduje nespecifičnom vezanju okolnih RNA i njihovoj degradaciji (33,34). Smatra se da nespecifično cijepanje aktivira programiranu staničnu smrt ili stanje mirovanja bakterijskih stanica zaraženih bakteriofagom kako bi se ograničilo širenje infekcije kroz cijelu populaciju (19). U načelu, slično kao i kod CRISPR/Cas sustava V. tipa, nakon cijepanja ciljne RNA koja se najprije morala hibridizirati sa crRNA na kompleksu s Cas13 proteinom, odnosno nakon *cis* cijepanja, doći će do nespecifičnog cijepanja okolnih slobodnih RNA, odnosno do *trans* cijepanja.

1.3. Sustav CRISPR/Cas u molekularnoj biologiji

1.3.1. Povijesni pregled ključnih otkrića i mehanizam djelovanja sustava CRISPR/Cas kao molekularno-biološkog alata

Prve sekvence koje pripadaju sustavu CRISPR otkrivene su, kao što je spomenuto, 1987. godine (5,6), a potom su 2000. slične sekvence otkrivene u drugim tipovima bakterija i arheja (35). Naziv CRISPR za navedeni lokus u primjeni je od 2000. godine (36), a otkrića godine 2005. pokazala su podrijetlo *spacer* sekvenci, identificirala slijed PAM, a pretpostavljena je i obrambena uloga sustava CRISPR (35,37), koja je dokazana dvije godine kasnije (2). U sljedećih nekoliko godina otkriven je mehanizam djelovanja sustava CRISPR/Cas kao obrambenog sustava prokariota, a prvo uređivanje eukariotskog genoma (engl. *genome editing*) uz korištenje sustava CRISPR/Cas bilo je 2013. godine (38,39). Nisu prošle niti dvije godine a već je za uspješan *in vitro* popravak gena za distrofin u mišjim stanicama koje su potom implantirane u miša korišten mutipleks sustav CRISPR/Cas za uređivanje (40), a iste je godine CRISPR korišten po prvi puta i za uređivanje humanih embrija (41). Godine 2016. započela su i klinička istraživanja s ovom tehnologijom, a prvoj primjeni sustava CRISPR/Cas za dijagnostiku svjedočili smo 2020. godine, za detekciju prisutnosti virusa SARS-CoV-2. Zbog svega navedenog, i vrlo obećavajuće široke primjene u budućnosti, nimalo ne začuđuje činjenica da su znanstvenici Emmanuelle Charpentier iz Njemačke te Jennifer Doudna iz Sjedinjenih Američkih Država, za uspostavljanje metode za uređivanje genoma korištenjem sustava CRISPR, nagrađeni Nobelovom nagradom 2020. godine (42).

Njihova je namjera, u kojoj su uspjeli, bila modificirati sustav CRISPR/Cas na način da se njime može ciljati bilo koja specifična sekvenca u bilo kojem organizmu i da se može potaknuti njezino cijepanje. Time se, ovisno o posljedičnom mehanizmu popravka DNA, omogućava uređivanje gena bilo ubacivanjem sekvenci (engl. *knock-in*), ili njihovim izbacivanjem (engl. *knock-out*). Preciznije, Doudna i Charpentier su uspjeli modificirati kompleks Cas-9 u kompleks koji je lakše kontrolirati, fuzionirajući dvije molekule RNA (*tracrRNA* i *crRNA*) u sintetsku „jedno-

vodeću“ (engl. *single-guide* RNA, sgRNA), koja je dovoljna za pronalazak i izrezivanje ciljane DNA od interesa (38). Tijekom iste godine i druga je grupa znanstvenika došla do istog zaključka i potvrdila funkcionalnost njihove metode (43). Kimerna molekula RNA, odnosno sgRNA, konstruirana je fuzijom 3' kraja crRNA s 5' krajem tracrRNA, oponašajući na taj način dvostruku RNA strukturu koja je potrebna za specifično cijepanje DNA uz djelovanje proteina Cas. Molekula sgRNA na svom 5' kraju sadrži sekvencu nužnu za prepoznavanje ciljane molekule nukleinske kiseline, iza koje slijedi struktura ukosnice (engl. *hairpin*) koja sadržava jednake interakcije povezivanja parova baza kakve nastaju u prirodnom dupleksu tracrRNA i crRNA (38). Ova metoda omogućava stvaranje sgRNA bilo koje sekvence (tj. one koja nam je potrebna) *in vitro*, a ta sekvenca usmjerava endonukleazu Cas-9 na točno određeno mjesto u genomu. Kada sgRNA prepozna homologni slijed, Cas-9 kida molekulu DNA. To pak potiče popravak DNA, koji se može dogoditi dvama različitim mehanizmima, i imati drukčije posljedice. Mehanizam nehomolognog povezivanja krajeva (engl. *non-homologous end joining*) je sklon pogreškama, pa posljedično dovodi do inaktiviranja gena (engl. *knock-out*). Međutim, ukoliko je prisutan prikladan egzogeni kalup (nazivamo ga donorska DNA), on se može koristiti za homologan popravak DNA, pri čemu se izvorna sekvenca zamjenjuje nekom drugom sekvencom od izbora. Na taj se način mogu a) uvesti specifične mutacije u sekvencu divljeg tipa (što za posljedicu može imati *knock-out*), ili se na taj način može b) vratiti mutirani gen u divlji oblik gena (genska modifikacija) ili se c) ubaciti cijeli novi gen ili čak višestruke kopije gena (*knock-in*). Donorska DNA može teorijski biti bilo koje veličine, od nekoliko baznih parova kojima se mogu ciljati točkaste mutacije, do velikih segmenata DNA koji mogu sadržavati jedan ili više gena zajedno sa specifičnim promotorima i dodatnim regulatornim elementima. Cjelokupan je sustav relativno jednostavan za primjenu, učinkovit te omogućava precizno ciljanje DNA odnosno promjenu unutar točno određenog dijela genoma, te se zbog tih osobina vrlo brzo počeo široko koristiti za uređivanje genoma kako u biljkama, tako i u životinjama, uključujući i ljude (12).

1.3.2. Primjena sustava CRISPR/Cas u ne-medicinskim područjima ljudske djelatnosti

Moćna tehnologija modifikacije genoma kakva je CRISPR/Cas ne samo da je revolucionalizirala moderan pristup liječenju humanih bolesti, već je svoje primjene našla i u drugim segmentima ljudskih djelatnosti, zbog mogućnosti da se njome modificiraju genomi kako prokariotskih, tako i eukariotskih organizama. Njezinom primjenom organizmi se mogu modificirati na načine da više udovoljavaju estetskim zahtjevima trenutnog tržišta. Intenzivnije boje, veća veličina, te pravilniji izgled cvjetova i voća (44,45), pa čak i smanjenje veličina životinja što bi ih činilo poželjnim kućnim ljubimcima (kao što je dizajniranje „mikro-svinja“ (46)), primjeri su takve primjene. No naravno, estetika je ipak najmanje bitna – nemjerljivo je važnija primjena ove tehnologije u agrikulturi i mesnoj industriji koja ima veliki utjecaj na financijsku dobit navedenih djelatnosti. Obzirom da je biljke lako modificirati, ova se tehnika koristi za poboljšanje usjeva na različite načine – povećanjem prinosa, povećanjem nutritivne vrijednosti, za lakše kontroliranje sazrijevanja voća, kao i za stvaranje biljaka otpornih na parazite ili okolišne stresore (12). Uz to, koristi i u svrhe smanjenja alergeni svojstava kako biljnih proizvoda (primjerice soje (47), ili stvaranje bezglutenske ili nisko-glutenske pšenice pogodne za ljude koji boluju od celijakije) (48,49) tako i proizvoda životinjskog podrijetla (kravljeg mlijeka (50) te jaja) (51). Kako ljudi životinje uzgajaju u prehrambene svrhe, veliki im problem čini obolijevanje životinja. Intervencijom u njihov genom može se povećati otpornost na različite bolesti, a najčešći je pristup da se promijene proteini domaćina koje neki virus ili bakterija koristi kako bi adherirao na stanicu domaćina i inficirao je. Metodologijom CRISPR/Cas po spomenutom principu stvorene su svinje otporne na virus PRRSV (engl. *Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus*) i virus afričke svinjske groznice. Peradarstvo također može imati velike koristi od stvaranja kokoši otpornih na različite, za njih (ali i za nas) pogubne mikroorganizme, kao što su virus ptičje gripe ili virus ptičje leukoze (52). Svinje se također mogu modificirati kako bi se poboljšala njihova ksenotransplantacijska svojstva, obzirom na veliki potencijal korištenja njihovih organa u humanoj medicini (53,54). No, valja uzeti u obzir da svaka modifikacija genoma, posebice nasljedna i ona koja nije ograničena samo na

pojedine jedinke, već na velike populacije, može imati nepredviđene posljedice kako za opstanak same vrste, tako i na druge karike u ekološkom sustavu. Takve modifikacije uvijek donose etičke dvojbe, posebno naglašene kada je riječ o modifikaciji humanog materijala, kao što je prilikom korištenja ove tehnologije u biomedicini.

1.3.3. Primjena sustava CRISPR/Cas u biomedicini

Sustav CRISPR/Cas svoju najmoćniju primjenu svakako nalazi u različitim segmentima medicine, koja seže od osnovnih istraživanja patofiziologije, preko razvoja lijekova, pa sve do terapijskih postupaka čak i na embrijima. Jedna je od najširih primjena svakako mikrobiološka, ona kojom se ciljaju geni virulencije, geni za rezistenciju te geni uključeni u proces stvaranja biofilмова. Drugi segment je već spomenuto izučavanje molekularnih mehanizama uključenih u interakcije patogena i domaćina. Uz to, moguće je ovom tehnikom i eliminirati viralni genom iz humanih stanica, kao što je pokazano s virusom hepatitisa B (55). Stvaranje animalnih modela bolesti modifikacijom životinjskog genoma omogućava izučavanje ne samo etiologije bolesti, već je izrazito korisno u samom procesu dizajniranja i validacije novih terapijskih postupaka. Uporabom metodologije CRISPR/Cas modificirani su genomi uobičajenih organizama koji se koriste kao modelni organizmi, kao što su *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, ali i stanice svinja, miševa i krava. Veliki je napredak po tom pitanju postignut u izučavanju ponajviše tumora, ali i neuroloških bolesti, kardiovaskularnih bolesti, imunodeficijencije, cistične fibroze, te mnogih drugih (55–61). Sistematski pregled trenutnog stanja metodologije u navedenim područjima dat je u preglednim radovima koje su priredili El Ouar i sur. (42), Piergentili i sur. (12), Alagoz i sur. (56) te Karimian i sur. (61). Ciljni geni kod tumora su mahom geni regulatori staničnog ciklusa te geni za telomerazu. Pokazano je da se primjenom ove tehnologije mogu ukloniti spolni kromosomi iz mišjih stanica u kulturi, embrija kao i tkiva *in vivo*, kao i humanih stanica u kulturi, što ukazuje na potencijal tretiranja aneuploidnih tumorskih stanica, ali i poremećaja broja kromosoma kao što je Downov sindrom (62). U genskoj terapiji prvu primjenu je metodologija CRISPR/Cas omogućila za liječenje

monogenske bolesti uzrokovane defektnim genom, preciznije za ispravak mutacije u genu za hemoglobin koja posljedično dovodi do beta-talasemije (63). Značajan pomak desio se i na polju liječenja virusnih bolesti, posebice infekcije virusom HIV-1, gdje je na mišjim modelnim organizmima inaktivirana i uklonjena većina provirusa putem tehnologije CRISPR/Cas (64).

1.3.4. Primjena sustava CRISPR/Cas u dijagnostici

Kako bi se pravilno i točno dijagnosticirale, genske te zarazne i emergentne bolesti zahtijevaju korištenje sofisticirane i skupe dijagnostičke opreme te prisutnost stručnog i obrazovanog osoblja što su uvjeti koji nekada ne mogu biti zadovoljeni u pojedinim dijelovima svijeta s ograničenim resursima. Dijagnostički alati temeljeni na metodologiji CRISPR/Cas već sada omogućuju brzo i točno određivanje strane nukleinske kiseline u organizmu, primjerice virusne ili bakterijske RNA ili DNA. Nove dijagnostičke metode temeljene na sustavu CRISPR/Cas koriste njihovo svojstvo da posjeduju aktivnost kolateralnog cijepanja okolnih molekula RNA i DNA nakon cijepanja ciljne molekule, što se pokazalo kao dobra karakteristika za izradu molekularno-dijagnostičkih testova u kombinaciji s drugim metodama za vrlo osjetljivu i specifičnu detekciju RNA i DNA (65). Kolateralno cijepanje koje vrše sustavi V. i VI. tipa, odnosno njihovi pripadajući proteini Cas12 i Cas13 omogućava genetičko preuređivanje sgRNA da najprije navode cijepanje na ciljnu molekulu DNA ili RNA, a potom cijepaju nespecifične susjedne nukleinske kiseline koje mogu biti obilježene fluorescentnim bojama ili nekom drugom molekulom reporterom (66). Programiranje mehanizma CRISPR/Cas omogućuje lako prilagođavanje različitim ciljnim molekulama i veću specifičnost, zadržavajući pritom odgovarajuću osjetljivost. Razvoj metodologije CRISPR/Cas u moderne dijagnostičke alate započeo je 2012. godine s prvim eksperimentima rekonstrukcije CRISPR/Cas9 sustava *in-vitro* (67). Ubrzo nakon, već 2013. godine uslijedilo je prvo uređivanje ljudskog genoma također korištenjem kompleksa CRISPR/Cas9 (68). Godine 2016. osmišljena je metoda za detekciju virusa Zike (ZIKV), koja je nazvana NASBA-CRISPR cijepanje, a uključivala je

izotermalno umnažanje molekule RNA (engl. *nucleic acid sequence based amplification*) kojoj je slijedila reverzna transkripcija u cDNA te prepoznavanje iste i cijepanje sustavom CRISPR/Cas9. Pocijepane DNA molekule aktivirale su potom senzorske molekule koje su bile kolorimetrijski detektirane i označavale prisutnost virusa Zike (69). Godinu dana nakon, osmišljena je nova metoda temeljena na aktivnosti proteina Cas13, a nazvana je SHERLOCK prema engl. *Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing*, koja je po prvi puta uključivala detekciju molekula RNA na temelju svojstva kolateralnog cijepanja proteina Cas13. Metoda SHERLOCK korištena je za detekciju prisutnosti virusa Zike i virusa denge (DENGV) u ispitivanim uzorcima (70). Godine 2018. metoda SHERLOCK dobila je svoju poboljšanu verziju nazvanu SHERLOCKv2, a osmišljena je i nova metoda nazvana DETECTR koja je po prvi puta koristila protein Cas12 kao efektor u cijepanju ciljnih DNA. Metodom DETECTR detektirani su humani papiloma virusi (HPV) te je također omogućeno razlikovanje sojeva visokog rizika za karcinom vrata maternice, sojeva HPV16 i HPV18 (71). Godine 2019. razvoj metodologije otišao je još korak dalje u razvoj metode CRISPR-Chip gdje je korištenje CRISPR/Cas9 sustava omogućeno za detektiranje polimorfizama jedne baze odnosno SNP-ova (engl. *single nucleotide polymorphism*) na imobiliziranom grafenskom tranzistoru i udruženo s potenciometrijom kao metodom detekcije (72). Izbijanje pandemije Covid-19 uzrokovane virusom SARS-CoV-2, kojoj i trenutno svjedočimo, uzrokovala je globalnu potrebu za enormno velikim brojem testiranja, što je ubrzo ukazalo na zagušenost sustava primjenom jedne metode za detekciju, u konkretnom slučaju lančane reakcije u stvarnom vremenu, odnosno PCR-a (engl. *polymerase chain reaction*). Preveliko opterećenje i potreba za masovnim testiranjem posljedično dovodi do nedostataka potrebnih uređaja i detekcijskih kompleta u određenom periodu, što može usporiti rano otkrivanje zaraze i pravovremeno sprečavanje širenja virusa te pandemiju staviti pod kontrolu. Globalna borba protiv virusa SARS-CoV-2 uvelike je pridonijela ubrzanom razvoju metodologije CRISPR/Cas u dijagnostičke svrhe te su vrlo brzo nakon izbijanja pandemije dorađene postojeće i razvijene nove platforme koje omogućuju brzu i pouzdanu virusnu dijagnostiku bez potrebe za korištenjem skupe i često nedostupne aparature. U nastavku ovog rada opisat će se, objasniti

i usporediti različite metodologije sustava CRISPR/Cas koje su razvijene u dijagnostičke platforme temeljene na detekcijskom sustavu II. tipa (metoda CRISPR-Chip), platforme temeljene na detekcijskom sustavu V. tipa (DETECTR, HOLMES, HOLMESv2, STOPCovid) te platforme temeljene na detekcijskom sustavu VI. tipa (SHERLOCK, SHERLOCKv2 te CARMEN) od kojih su neke već odobrene za rutinsku uporabu u određenim zemljama.

2. Cilj istraživanja

2. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je sažeto prikazati primjene metodologije CRISPR/Cas u biomedicini i dijagnostici te dati detaljan pregled trenutno postojećih dijagnostičkih platformi temeljenih na CRISPR/Cas sustavu, kao i dijagnostičkih platformi koje su još u fazi razvoja.

Hipoteze istraživanja su:

1. Metodologija CRISPR/Cas osim široke primjene temeljene na mogućnosti uređivanja genoma ima i velik dijagnostički potencijal.
2. Dijagnostičke platforme temeljene na metodologiji CRISPR/Cas u uznapređivaloj su fazi i izgledno je da će u vrlo bliskoj budućnosti biti u široj uporabi za dijagnostiku zaraznih bolesti.
3. Daljnji razvoj metodologije CRISPR/Cas za dijagnostičke svrhe vjerojatno će dovesti do stvaranja dijagnostičkog alata koji će biti jednako kvalitetna alternativa dijagnostičkoj primjeni lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (*real-time* PCR).

3. Materijal i metode – sustavni pregled saznanja o temi

3. Materijal i metode – sustavni pregled saznanja o temi

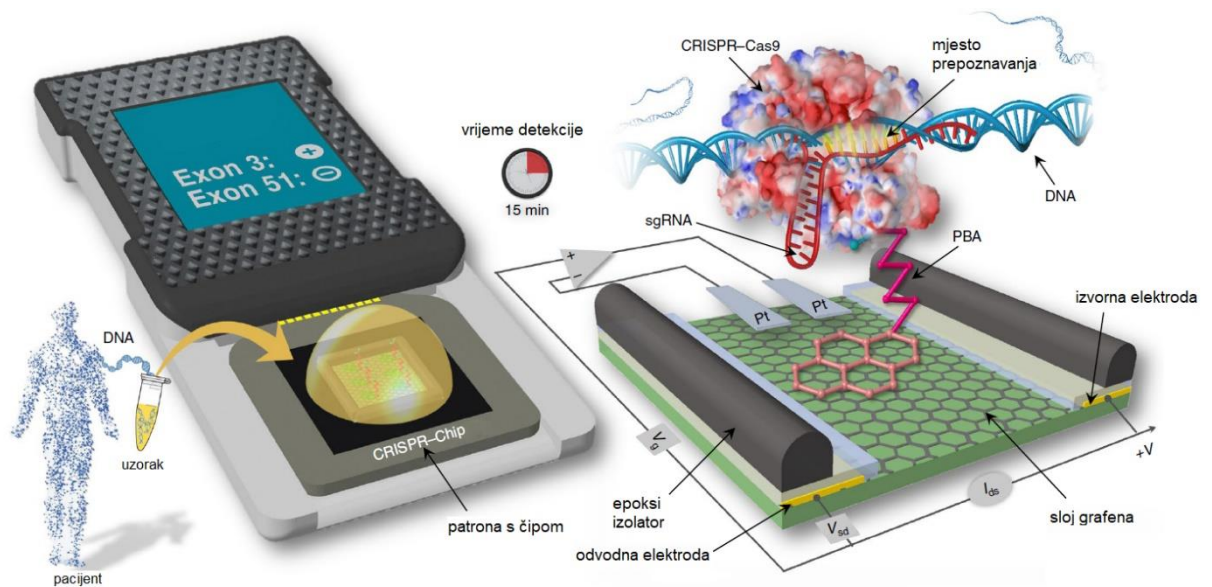
Zhang i suradnici osmislili su prvi dijagnostički 2017. godine test kreiran na temelju CRISPR/Cas sustava klase 2, a koji se temeljio na katalitičkoj aktivnosti proteina Cas9 ili njegove neaktivne (engl. *null*) varijante dCas9 (engl. *Dead Cas9*) u čiju sekvencu je uvedena *null* mutacija, koja stvara krnji protein Cas9 i na taj način oduzima njegovu nukleaznu aktivnost (73). Metoda koju su osmislili Zhang i suradnici temelji svoj mehanizam rada na dva proteina dCas9 koji kada su spojeni domenama (engl. *split domains*) enzima luciferaze (73) uzrokuju otpuštanje luminiscentnog signala. Nakon što ciljna molekula DNA bude prepoznata od strane dvaju proteina dCas9, taj proces uzrokuje rekonstituciju enzima luciferaze i otpuštanje svjetlosnog signala koji se može mjeriti luminometrom i na taj način kvantificirati. Na ovaj način po prvi puta je s visokom specifičnošću i osjetljivošću detektirana bakterija *Mycobacterium tuberculosis*, što je bio dokaz ispravnog osmišljanja dijagnostičkog eksperimenta. Zhang i suradnici iste su godine osmislili dijagnostički test za detekciju humanog papiloma virusa (HPV) uz pomoć proteina Cas9 čije je cijepanje bilo usmjereno prema virusnim genima L1 i E6 i E7. Detekciji virusnih gena najprije je prethodilo umnažanje metodom lančane reakcije polimerazom, tj. metodom PCR. (74), nakon čega je uslijedilo cijepanje proteinom Cas9 te ponovno umnažanje pocijepanih fragmenata metodom PCR. Tako pocijepani fragmenti detektirani su elektroforezom na gelu te je na temelju veličine fragmenata DNA bilo moguće jasno diskriminirati između virusnih sojeva HPV16 i HPV18 koji su odgovorni za nastanak karcinoma vrata maternice u žena (74). Naknadne dorade ove metode omogućile su fluorescentno obilježavanje ciljnih molekula virusnih gena te je detekcija bila moguća putem metode *real-time* PCR, čime se iz upotrebe izbacila vizualizacija putem gel elektroforeze. Iako je do danas razvijeno 40-tak i više detekcijskih metoda temeljenih na sustavima CRISPR/Cas (75), u nastavku poglavlja metoda opisat će se najosjetljivije metode koje mogu detektirati iznimno niske koncentracije patogena (niže od 10^{-15} M) te poslužiti kao dijagnostički alati visoke osjetljivosti i specifičnosti.

3.1. CRISPR detekcijski sustavi II. tipa

3.1.1. CRISPR-Chip

Ogroman korak u razvoju metodologije CRISPRCas u dijagnostici napravljen je razvojem metode CRISPR-Chip. Metoda CRISPR-Chip objedinjuje mehanizam CRISPR/Cas i tehnologiju elektronskih tranzistora napravljenih od grafena koje još nazivamo i gFET (engl. *graphene-based field-effect transistor*) gdje čitava platforma funkcionira kao biosenzor. Grafenski elektronski tranzistori sastavljeni su od jednog tankog sloja atoma ugljika na koje se vežu, odnosno imobiliziraju *null* mutanti proteina Cas9, tj. već prethodno spomenuti protein dCas9, a sloj grafena služi kao spona između dviju elektroda kroz koje konstantno protječe električna struja (74). Komplekse nukleazno nefunkcionalnog proteina dCas9 u literaturi još možemo pronaći pod nazivom dRNP (engl. *dead ribonucleic proteins*) što označava nefunkcionalan ribonukleinski kompleks sastavljen od proteina Cas9 i pripadajućih sgRNA, čija je uloga u metodi CRISPR-Chip prepoznavanje ciljne molekule DNA, njeno odmatanje i prepoznavanje sekvence PAM te vezanje ciljne molekule DNA na temelju komplementarnosti s molekulom sgRNA. Izrada CRISPR-Chipa uključuje vezanje molekule pirenbutiratne kiseline (PBA) na nefunkcionalnu rešetku grafena, koja potom služi kao sidro za kovalentno vezanje proteina dCas9 čiji se broj mjeri u tisućama na jednom takvom tranzistoru (38,72). Slobodna mjesta na molekulama pirenbutiratne kiseline na koja se nije vezao dCas9, blokiraju se molekulom PEG (amino-polietilen glikol 5-alkohol) nakon čega je protein dCas9 spreman za vezanje s molekulom sgRNA. Afinitet za vezanje molekule DNA iz različitih vrsta organizama postiže se uvođenjem 20 nukleotida dugačke sekvence na sgRNA koja je komplementarna molekuli DNA od interesa, čime ova metoda dobiva stupanj visoke modularnosti i primjenu za detekciju širokog spektra entiteta. Prilikom stavljanja biološkog uzorka u CRISPR-Chip, neće doći do cijepanja ciljnih molekula DNA, već samo do njihovog vezanja što uzrokuje pojavu elektrostatičkih interakcija na površini grafena koje mijenjanju električna svojstva grafenskog tranzistora na kojeg je vezan kompleks dRNP. Kao rezultat toga, interakcija između sgRNA-vođene nukleaze dCas9 i njene ciljne molekule DNA može se uočiti kao promjena električne

vodljivosti, koja se mjeri u stvarnom vremenu. Promjena električne vodljivosti lako se detektira putem detekcijskog sustava, odnosno čitača napona koji je spojen na računalo i software za analizu. Čitav proces od stavljanja uzorka, detekcije i analize može se zavisno o vrsti pretrage završiti u rasponu od 15 do 40 minuta. Grafički prikaz metodologije CRISPR-Chip nalazi se na slici 5.



Slika 5. Grafički prikaz metodologije CRISPR-Chip. Uzorak koji sadrži ciljne molekule stavlja se u patronu na kojoj se nalazi čip kroz koji prolazi električna struja napravljen od tankog sloja grafena na kojem su imobilizirani proteini Cas9 pomoću molekule PBA koja ima ulogu sidra. Vezanjem ciljnih molekula na kompleks Cas9-crRNA mijenjaju se električna svojstva grafenskog tranzistora što odgovara vezanju ciljne molekule na CRISPR kompleks koje očitava software povezan na CRISPR-Chip detektor. Preuzeto i obrađeno iz rada (74).

Od pojave prve generacije CRISPR-Chip metode koja je bila usmjerena ka detekciji jednostavnih gena poput gena *bfp* za plavi fluorescentni protein (engl. *blue fluorescent protein*), do danas su usavršavanjem ove metode i korištenjem brojnih ortologa proteina Cas koji su imobilizirani na grafenski tranzistor izvedeni uspješni eksperimenti za otkrivanje genskih mutacija od kojih je najznačajnija ona za Duchenneovu mišićnu distrofiju (DMD) koje se nalaze u genu za protein distrofin, odgovoran za nastanak bolesti. Bez prethodnog korištenja ikakvih metoda za umnažanje nukleinskih kiselina, metodom CRISPR-Chip uspješno su i specifično otkrivene delecije kod dvije ciljne sekvence pacijenata zahvaćenih s DMD uz pomoć umjetno

konstruiranih sgRNA koje su imale homologiju s ciljnim molekulama. Rezultati ovakvih istraživanja pokazuju da se aplikacije metode CRISPR-Chip mogu proširiti i na multipleksnu analizu ostalih egzona unutar gena za protein distrofin jednostavnom modifikacijom molekule sgRNA unutar kompleksa dRNP, ali i praktički za bilo koji drugi gen od interesa. Ovim načinom mogao bi se raditi probir pacijenata s povećanim rizikom za razvoj raznih monogenских bolesti, čime bi sama terapija i ishod liječenja bolesti bili kudikamo bolji i brži. U kontekstu bolesti DMD, svaki egzon u genu za distrofin mogao bi uz pomoć modificiranih sgRNA biti usmjeren na otkrivanje delecija egzona koji uzrokuju bolest. Pokazalo se da metoda CRISPR-Chip ima visoku osjetljivost i omogućava detekciju femtomolarnih količina ciljne DNA u uzorku (10^{-15} M), odnosno konkretno na primjeru istraživanja bolesti DMD, metoda je pokazala graničnu vrijednost detekcije ili LOD (engl. *limit of detection*) u vrijednosti od od 1,7 fM ciljne molekule DNA bez korištenja ikakve prethodne metode amplifikacije nukleinskih kiselina. U jeku kontinuiranog razvoja CRISPR/Cas metodologije u dijagnostici, tijekom 2021. godine objavljena su istraživanja u kojima je opisana detekcija brojnih polimorfizama jedne baze (SNP) te su detektirane točkaste mutacije povezane s bolestima poput srpaste anemije stanica ili amiotrofične lateralne skleroze (ALS) (72,75).

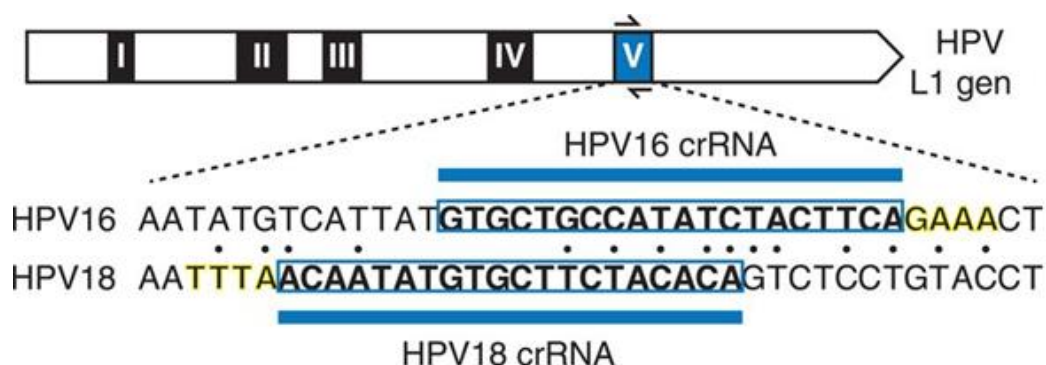
Otkrivanje polimorfizama ili točkastih mutacija metodom CRISPR-Chip može u budućnosti učiniti dijagnostiku monogenских bolesti preciznom, brzom i jednostavnom, budući da metodologija ne zahtijeva korištenje instrumenata za amplifikaciju nukleinskih kiselina niti optičke čitače, međutim izvori navode kako se metoda CRISPR-Chip ne očekuje u rutinskoj dijagnostičkoj primjeni prije 2025. godine.

3.2. CRISPR detekcijski sustavi II. tipa

3.2.1. DETECTR

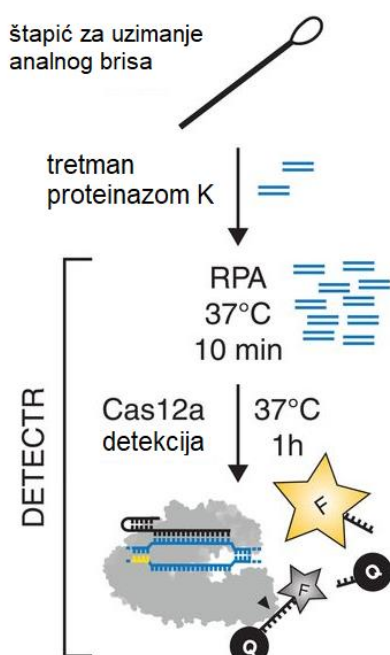
Metodu DETECTR (akronim iz engl. *DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter*) kao dijagnostičku platformu razvili su i predstavili 2018. godine dobitnica Nobelove nagrade Jennifer Doudna i njeni suradnici, a temelji se na kolateralnoj aktivnosti proteina Cas12 da nespecifično pocijepa okolne DNA nakon specifičnog cijepanja jednolančane ili dvolančane DNA (76). Autori ove metode su za cijepanje koristili protein Cas12 iz bakterije *Lachnospiraceae* ND2006, odnosno LbCas12a, koji kada je u reakciji združen sa odgovarajućom crRNA za prepoznavanje ciljne molekule i probama u obliku jednolančanih molekula DNA obilježenim reporter molekulama, može pocijepati ciljnu DNA i potom obilježene probe koje daju fluorescentni signal. Probe su dizajnirane po principu konvencionalnih *TaqMan* proba koje se koriste u metodi *real-time PCR*, gdje je na 5' kraju probe vezana molekula reportera u obliku fluorofora (engl. *fluorofore*), a na drugom 3' kraju utišavač fluorescencije (engl. *quencher*). Protein LbCas12a pokazuje aktivnost koja je ovisna o prisutnosti sekvence PAM kada je u pitanju cijepanje dvolančane ciljne molekule DNA (cis cijepanje) te cijepanje neovisno o prisutnosti sekvence PAM kada je u pitanju cijepanje jednolančanih fluorescentno obilježenih DNA (trans cijepanje). Cijepanje DNA probe proteinom LbCas12a oslobađa molekulu fluorofora čiji se stabilni i jaki fluorescentni signal može očitati putem fluorometra. Prije same detekcije metodom DETECTR, nukleinske kiseline od interesa potrebno je izotermalno umnožiti metodom rekombinazne polimerazne amplifikacije, tj. RPA umnažanjem (engl. *recombinase polymerase amplification*). Umnažanje metodom RPA povećava analitičku osjetljivost metode DETECTR te predstavlja jednostavniju i jeftiniju alternativu metodi PCR za čije je izvođenje potrebno korištenje skupe instrumentacije. Neke od prvih aplikacija metode DETECTR korištene su za detekciju visokorizičnih sojeva humanog papiloma virusa (HPV) pri čemu su crRNA dizajnirane tako da vode protein Cas12a u cijepanje hipervarijabilne V petlje

u genu L1 virusa HPV, koja se između visokorizičnih sojeva HPV16 i HPV18 razlikuje u samo 6 nukleotida, što je prikazano na slici 6.



Slika 6. Grafički prikaz hipervarijabilne V petlje u genomu virusa HPV. Na temelju razlika u svega nekoliko nukleotida, dizajnirane su HPV12 crRNA molekule i HPV18 crRNA molekule, koje vrše vođenje proteina Cas12a u cijepanje ciljnih molekula. Preuzeto i obrađeno iz rada (76).

Preliminarni rezultati pokazali su da je metodom DETECTR uspješno detekiran soj HPV16 sa točnošću 100% te soj HPV18 s točnošću od oko 92%, koji su kasnije bili dodatno podvrgnuti potvrdnim PCR testom. Ukupno vrijeme potrebno za izradu DETECTR testa bilo je 1 sat, a zabilježena osjetljivost metode za detekciju virusa HPV-a bila je 10^{-18} M (76). Grafički prikaz metode DETECTR nalazi se na slici 7.



Slika 7. Grafički prikaz metode DETECTR. Nakon uzimanja brisa, uzorak se tretira proteinazom K, nakon čega slijedi izotermalno RPA umnažanje i reakcija cijepanja i proteinom Cas12a. Preuzeto i obrađeno iz rada (76).

Metoda DETECTR, kao derivat metodologije CRISPR/Cas doživjela je svoju prvu primjenu u veterinarskoj dijagnostici prilikom razvoja novog dijagnostičkog alata visoke protočnosti za detekciju virusa afričke svinjske gripe (ASFV) koji je uzročnik bolesti gripe sa stopom visokog mortaliteta svinja, što uzrokuje goleme probleme i gubitke u prehrambenoj industriji. Protein Cas12a, vođen s posebno dizajniranom crRNA usmjerenoj prema virusu ASFV uspješno se može vezati i pocijepati virusnu DNA te kolateralno pocijepati okolne DNA probe i time potvrditi prisutnost virusa. Uz korak izotermalnog RPA umnažanja koji prethodi detekciji metodom DETECTR, zabilježeni su rezultati visoke osjetljivosti, do 10^{-15} M (77).

Metoda DETECTR doživjela je svoj dodatni razvoj pojavom epidemije Covid-19 uzrokovane virusom SARS-CoV-2 koji je u potpunosti izmijenio dinamiku tržišta dijagnostike i stvorio potrebu za proizvodnjom velikog broja dijagnostičkih kompleta te globalnim testiranjem. Prva primjena metode DETECTR u svrhu Covid-19 dijagnostike uključivala je izotermalno umnažanje u trajanju od 20-30 minuta na 62°C kojem je prethodila reverzna transkripcija budući da je SARS-CoV-2 prema svojoj biologiji RNA virus. Korištenjem specifičnih početnica su nakon reverzne transkripcije umnoženi geni E (engl. *envelope*) i geni N (engl. *nucleoprotein*) virusa SARS-CoV-2 budući da je prisutnost oba gena u uzorku potrebna za potvrdu infekcije. Ribonukleinski kompleks sastavljen od proteina Cas12 i SARS-CoV-2 crRNA usmjeren je na cijepanje gena E i gena N te jednolančanih DNA proba obilježenih dvjema molekulama reporterima; biotinom i molekulom FITC, a umjesto molekule FITC može se koristiti i molekula FAM. Za samu reakciju prepoznavanja i cijepanja virusnih nukleinskih kiselina i DNA proba potrebno je oko 10 minuta (78). Detekcija virusa SARS-CoV-2 metodom DETECTR vizualizirana je na imunokromatografskom testu kojeg još zovemo rapid test ili 'lateral flow' test (engl. *lateral flow immunochromatographic assay*), koji ima jednostavan i intuitivan princip rada. Imunokromatografski test dizajniran je na način da pokazuje signal na dvije linije, testnoj i kontrolnoj liniji od kojih svaka ima afinitete za vezanje drugačijih proteina. Na testnoj liniji vezano je protutijelo koje ima afinitet za anti FITC protutijelo koje se nalazi na nanočesticama u imunokromatografskom testu, a na kontrolnoj liniji vezan je streptavidin koji ima afinitet za

biotin. Kada dođe do kolateralnog cijepanja DNA proba proteinom Cas12, doći će do razdvajanja molekula reportera biotina i FITC-a. Molekula biotina veže se za streptavidin na kontrolnoj liniji i na taj način daje vizualni signal, a molekula FITC veže se na anti FITC protutijelo na nanočesticama koje su sastavni dio matriksa imunokromatografskog testa. Prilikom prolaska uzorka kroz imunokromatografski test, nanočestice koje na sebi imaju vezan FITC zaustavit će se i vezati za imobilizirano protutijelo koje ima afinitet za anti FITC protutijela na površini nanočestica i na taj način dati vizualni signal na području testne linije. Vizualni signal dobiven na imunokromatografskom testu može se uočiti već nakon 5 minuta. Daljnjom analizom osjetljivosti testa ustanovljeno je kako metoda DETECTR ima graničnu vrijednost detekcije, odnosno LOD vrijednost 1 do 2.5 virusne kopije virusnih po mikrolitru uzorka, što je čini gotovo jednako osjetljivom kao i metodom lančane reakcije u stvarnom vremenu kojoj prethodi reverzna transkripcija (qRT-PCR), koja se u dijagnostici virusa SARS-CoV-2 uvriježila kao zlatni standard (75,78).

3.2.2. HOLMES

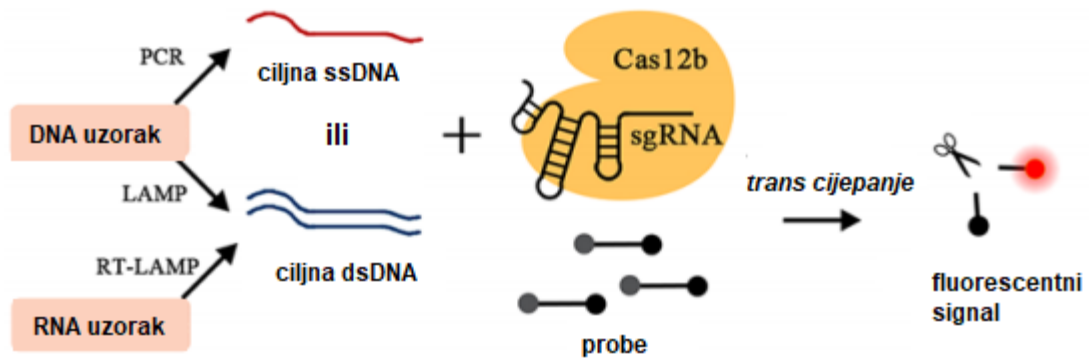
Metoda HOLMES (akronim in engl. *one-hour low-cost multipurpose highly efficient system*), poput metode DETECTR također koristi protein Cas12a koji uz odgovarajuću sgRNA vodi ribonukleinski kompleks u cijepanje ciljne molekule DNA uz kolateralno cijepanje okolnih jednolančanih DNA obilježenih molekulom reporterom. Za razliku od metode DETECTR koja koristi izotermalno RPA umnažanje ciljnih molekula DNA, metoda HOLMES koristi metodu PCR kako bi umnožila fragmente ciljne DNA, čime ova metoda već na svom početku zahtjeva korištenje nešto sofisticiranije i skuplje laboratorijske opreme. Tijekom PCR reakcije umnažanja, koriste se posebno konstruirane početnice koje služe za uvođenje sekvence PAM na krajevima amplikona, nakon čega slijedi miješanje s reakcijskom smjesom proteina Cas12a i crRNA kojima se odvija detekcija nukleinskih kiselina od interesa preko trans cijepajućeg mehanizma fluorescentno obilježenih DNA proba (30,79). Određivanjem osjetljivosti metode

ustanovljeno je kako metoda HOLMES ima minimalnu detektabilnu koncentraciju ciljne molekule u vrijednosti 10^{-18} M što je čini izuzetno osjetljivom i posve usporedivom s metodom PCR ili *real-time* PCR (79). Primjena metode HOLMES dosad je najviše bila upotrebljavana za detekciju polimorfizama jedne baze (SNP) i određivanje homozigotnih i heterozigotnih genotipova u čovjeka, međutim napravljena su uspješna istraživanja kod kojih se HOLMES koristio za detekciju virusnih infekcija, posebice virusa japanskog encefalitisa (JEV) koji se prenosi komarcima iz roda *Culex* i uzrokuje ozbiljnu upalu mozga i moždanih ovojnica. Budući da se radi o RNA virusu važno je bilo napraviti reverznu transkripciju nakon čega je uslijedio korak PCR umnažanja i detekcija metodom HOLMES. Kao i kod određivanja genotipova ili polimorfizama, visoka specifičnost metode HOLMES omogućava progamiranje i korištenje specifičnih crRNA za detekciju različitih virusnih sojeva (79).

3.2.3. HOLMES v2

Metoda HOLMESv2 funkcionira na potpuno isti način kao i metoda HOLMES uz dvije bitne razlike; metoda koristi termofilni protein Cas12b te umjesto PCR umnažanja ciljne DNA koristi petljom posredovano izotermalno umnažanje, odnosno LAMP (engl. *loop-mediated isothermal amplification*) kod kojeg se umnažanje odvija pri konstantnoj temperaturi od 60-65°C uz formiranje specifičnih petlji na krajevima amplikona koje olakšavaju i sudjeluju u eksponencijalnom stvaranju novih kopija amplikona. Metoda HOLMESv2 razvijena je kako bi se poboljšalo određivanje specifičnih polimorfizama, detektirala virusna RNA, ljudska mRNA i slobodna cirkulirajuća RNA te odredio stupanj metilacije DNA na ciljnim molekulama od interesa (77). Za vrijeme izvođenja cijepanja ciljnih DNA metodom HOLMESv2 kolateralna aktivnost postiže se unutar 10 minuta nakon prepoznavanja ciljnih jednolančanih molekula DNA pomoću proteina Cas12b, a može se produžiti na 30 minuta kada protein Cas12b prepozna dvolančanu DNA. Ovo svojstvo ukazuje na bitne razlike između Cas12b i Cas12a, pri čemu protein Cas12b pokazuje veću aktivnost prema jednolančanoj DNA što je bitno za

izradu različitih aplikacija ove metodologije. Shodno tim podacima, metoda HOLMESv2 prikladnija je za detekciju entiteta nakon kojih dolazi do kolateralnog cijepanja jednolančanih DNA što omogućuje otkrivanje tragova DNA i RNA u biološkim uzorcima (75). Grafički prikaz metode HOLMESv2 nalazi se na slici 8.

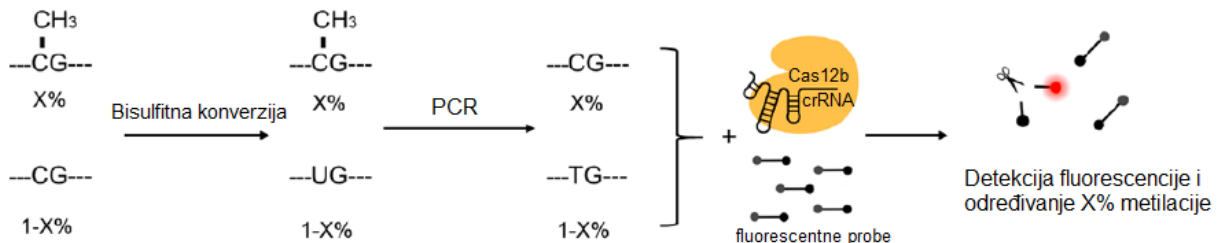


Slika 8. Grafički prikaz metodologije HOLMESv2. Izotermalnim LAMP i RT-LAMP umnažanjem omogućava se korištenje DNA i RNA polaznog materijala nakon čega slijedi cijepanje ciljnih molekula kompleksom Cas12b-crRNA te kolateralnih molekula reportera. Preuzeto i obrađeno iz rada (77).

Najniža koncentracija ciljne jednolančane ili dvolančane DNA koju može detektirati protein Cas12b je oko 1 nM. Kombinacijom metodologije CRISPR/Cas12b - crRNA i tehnologije LAMP umnažanja omogućuje se specifično otkrivanje od 10^{-17} M DNA, što je gotovo ekvivalentno osjetljivosti koju ima protein Cas12a korišten u metodi HOLMES (75).

U kontekstu epigenetičkih istraživanja, veliki naglasak stavlja se na određivanje stupnja metilacije ciljne DNA za koju je dokazano da je povezana s pojavom karcinoma kod ljudi (80). Određivanje stupnja metilacije DNA može se postići upotrebom metode HOLMESv2 uz bisulfitnu konverziju. Bisulfitna konverzija je proces deaminacije nemetiliranih citozina u uracil pri čemu metilirani citozini ostaju nepromijenjeni. Nakon bisulfitne konverzije, ciljna DNA se podvrgava reakciji PCR nakon čega se citozini produkata koji potječu od metiliranog lanca zamjenjuju nemetiliranim citozinima, a citozini nemetiliranog lanca zamjenjuju timinima, budući da su zbog bisulfitne konverzije inicijalno promijenjeni u uracile. Li i suradnici eksperimentalno su pokazali na primjeru gena za kolagen *COL1A2* kako se PCR produkti

metiliranih i nemetiliranih lanaca DNA mogu pomiješati s ribonukleinskim kompleksom Cas12b i crRNA konstruiranom za vođenje cijepanja na gen *COL 1A2* te fluorescentno obilježenim DNA probama, nakon čega slijedi očitavanje fluorescencije i određivanje postotka metilacije. Shematski prikaz metodologije grafički je prikazan na slici 9.



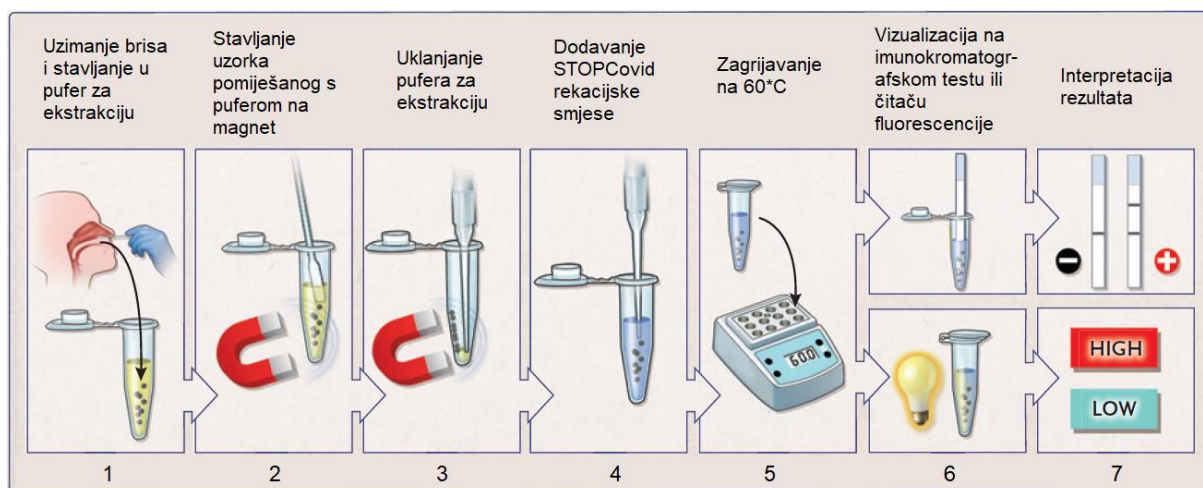
Slika 9. Grafički prikaz određivanja stupnja metilacije DNA putem metodologije HOLMESv2. Bisulfitnom konverzijom nemetilirani citozini prelaze u uracil, nakon čega se PCR umnažanjem zamjenjuju s timinom. Cijepanjem kompleksom Cas12b-crRNA i fluorescentnom detekcijom određuje se postotak metiliranih citozina. Preuzeto i obrađeno iz rada (77).

Rezultati određivanja stupnja metilacije DNA visoko su konzistentni s metodom sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS) koja je uz ostale metode sekvenciranja nukleinskih kiselina dosad korištena kao najpouzdanija metoda za određivanje stupnja metilacije. Zbog svoje visoke točnosti, brzine i ekonomičnosti izvedbe, metoda HOLMESv2 pokazuje veliki potencijal kao platforma za učinkovitu detekciju stupnja metilacije DNA (77).

3.2.4. STOPCovid

Metoda STOPCovid razvijena je isključivo za potrebe brze i visoko osjetljive detekcije virusa SARS-CoV-2 čija se osjetljivost može usporediti s metodom RT-qPCR. Metoda STOPCovid ime je dobila prema akronimu engleskog naziva *SHERLOCK testing in one pot* koja označava CRISPR/Cas detekciju virusa u jednom koraku i u jednoj reakcijskoj tubi te riječi Covid koja označava bolest uzrokovanu virusom SARS-CoV-2. Metodom STOPCovid vrši se

jednostavna izolacija virusne RNA, nakon koje slijedi petljom posredovano izotermalno umnažanje, odnosno LAMP umnažanje i naposljetku detekcija proteinom Cas12b iz bakterije *Alicyclobacillus acidiphilus* (AapCas12b). Specijalno dizajnirane crRNA vode protein AapCas12b u cijepanje ciljnih gena *Orf1ab* i N te kolateralnih fluorescentno obilježenih proba. Izolacija RNA odvija se jednostavnom izolacijom putem magnetskih kuglica te čitav proces traje oko 15 minuta. Izoliranim molekulama RNA na magnetskim kuglicama dodaje se STOPCovid reakcijska smjesa te se čitav sadržaj tubice zagrijava na temperaturu od 60°C na termobloku u trajanju od 10 minuta. Nakon inkubacije, sadržaj reakcijske smjese u reakcijskoj tubici spreman je za vizualizaciju putem imunokromatografskog testa ili čitača fluorescencije. Očitavanje putem imunokromatografskog testa vrši se identičnim mehanizmom kao i kod metode DETECTR na imunokromatografskoj trakici gdje se koristi afinitetno vezanje za molekule reportere FAM i biotin koje potom vezanjem nanočestica daju vizualni signal, dok se kod fluorescentnih čitača svjetlosni signal dobiva fluorescencijom koja dolazi od fluorofora HEX sa 5' kraja pocijepane probe. (81). Grafički prikaz metodologije STOPCovid nalazi se na slici 10.



Slika 10. Grafički prikaz metodologije STOPCovid. Uzorak kojem prethodi izolacija putem magnetskih kuglica stavlja se u reakcijsku smjesu STOPCovid, nakon čega slijedi zagrijavanje na temperaturi od 60C radi izotermalnog LAMP umnažanja. Detekcija se može vršiti putem imunokromatografskih trakica ili fluorescentnim čitačem. Preuzeto i obrađeno iz rada (81).

Nezavisna evaluacija metode STOPCovid pokazala je da test u uzorku brisa nazofarinksa od 50 ml ima osjetljivost od 93.1% te specifičnost od 98.5%. Metoda STOPCovid testa gotovo da nadmašuje metodu RT-qPCR prema graničnoj vrijednosti detekcije, odnosno LOD vrijednosti od oko 30 do 100 kopija RNA po mililitru, što ovu metodu čini potpuno prikladnom za korištenje u manje složenim laboratorijima ili mjestima testiranja s ograničenim resursima (75,81).

3.3. CRISPR detekcijski sustavi VI. tipa

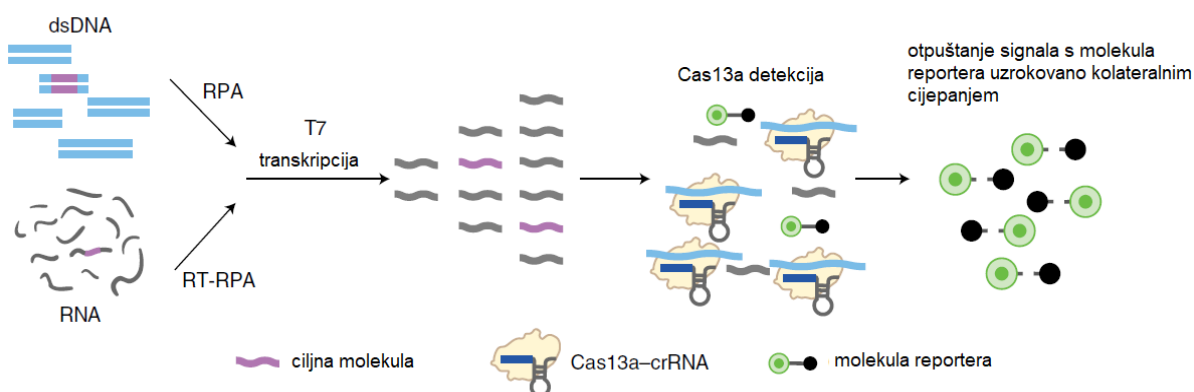
3.3.1. SHERLOCK

Zhang i suradnici su 2017. godine predstavili novu dijagnostičku metodu nazvanu SHERLOCK (engl. *specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking*) zasnovanu na sustavu CRISPR-Cas VI. tipa koja se temelji na aktivnosti nukleaze Cas13 iz bakterije *Leptotrichia shahii*. Dotad nepoznati protein Cas13a iz bakterije *Leptotrichia shahii* (LshCas13a) korišten je kako bi se pobliže istražile karakteristike ovog proteina i čitavog novog CRISPR sustava povezanog s njim, a koji je po prvi puta pokazao aktivnost cijepanja ciljnih i kolateralnih molekula RNA (65). Protein LshCas13a koristi kratku, oko 24 baze dugačku crRNA koja djeluje s molekulom Cas13a kroz motiv ukosnice bogatom uracilom i olakšava vezanje i cijepanje ciljne molekule RNA kroz niz konformacijskih promjena u proteinu Cas13a. Protein Cas13a tolerira pojedinačnu neusklađenost jedne baze između crRNA i ciljane sekvence, međutim učinkovitost rezanja Cas13a smanjuje se kada su prisutne 2 ili više neusklađenosti (32,65).

Dijagnostički sustav SHERLOCK može se podijeliti na 4 koraka koji redom uključuju; pripremu reagensa, izolaciju nukleinskih kiselina, izotermalno umnažanje ciljnih molekula te naposljetku detekciju proteinom Cas13a. Prvi korak pripreme reagensa danas je uvelike reducirano budući da su velikim uzletom razvoja dijagnostičke opreme reagensi s vremenom

postali tvornički spremni i kalibrirani za upotrebu (engl. *ready to use*). Izolacija nukleinskih kiselina može se napraviti ručnim komercijalno dostupnim kompletima ili instrumentima za automatsku izolaciju. Da bi se stvorili preduvjeti za očitavanje visoke osjetljivosti, pretraživanje ciljnih molekula proteinom Cas13 može se upariti s izotermalnim pretkorakom umnažanja, a to je najčešće rekombinazno polimerazno umnažanje (RPA). Reakcija se može izvesti kao reakcija u dva koraka, počevši s RPA reakcijom nakon koje slijedi kombinirani korak koji ujedinjuje transkripciju T7 RNA polimerazom i detekciju na principu cijepanja proteinom Cas13, no postoji i mogućnost da se svi koraci mogu istodobno izvesti u reakciji u jednoj reakcijskoj tubi. Najteži dio pripreme za pokretanje reakcije detekcije proteinom Cas13 jest samo pročišćavanje proteina budući da izvođenje *in vitro* CRISPR mehanizma zahtijeva rekombinantno eksprimiran i pročišćen protein Cas13. Ekspresija proteina Cas13 može se postići sa plazmidnog vektora temeljenog na pET vektorskom sustavu pri čemu se *cas13* gen od interesa uklonira u pET vektor i ubaci u Rosetta 2(DE3)pLysS Singles soj bakterije *Escherichia coli* te uzgaja na podlozi s antibiotikom ampicilinom. Prilikom dizajniranja eksperimenta detekcije temeljenog na Cas13, uobičajeno je crRNA dizajnirati za ortolog po izboru (obično je to LwaCas13a) najprije kao DNA, a zatim generirati crRNA pomoću *in vitro* reakcije transkripcije. Molekule crRNA mogu se alternativno naručiti kao gotove sintetičke RNA od komercijalnih dobavljača s kojima je moguće dobiti nešto bolje performanse dijagnostičkog testa. Prilikom izvođenja RPA umnažanja, za uspješnu SHERLOCK reakciju također je važno uzeti u obzir dizajn početnica kako bi se postigla maksimalna učinkovitost umnažanja. Uz to, početnice moraju uključivati promotor T7 RNA polimeraze. Za postizanje optimalnih rezultata, predlaže se korištenje dva RPA kompleta primera i dvije crRNA. U većini slučajeva bi obje kombinacije kompleta početnica i crRNA trebale raditi dobro, ali jedna od njih bi trebala dati maksimalni signal i osjetljivost što je preduvjet za izradu visoko osjetljivog dijagnostičkog testa. Dodatna pravila dizajna eksperimenta mogu se primijeniti kada se implementiraju druge mogućnosti metode SHERLOCK, poput specifičnosti detekcije polimorfizma jedne baze. Mogućnosti detekcije SNP polimorfizama pomoću proteina Cas13 može se dobiti i povećati uvođenjem jednog dodatnog pogrešno ugrađenog nukleotida u sekvenci crRNA, čime

kreiramo takozvano sintetičko neslaganje u nukleotidima (engl. *mismatch*). (11,70,75). Grafički prikaz rada metodologije SHERLOCK nalazi se na slici 11.



Slika 11. Grafički prikaz metodologije SHERLOCK. Uzorak DNA ili RNA umnaža se izotermalnim RPA umnažanjem uz obavezan pretkorak reverzne transkripcije za RNA uzorke. Umnoženi fragmenti se prevode u RNA putem T7 transkripcije nakon čega slijedi prepoznavanje od strane kompleksa Cas13-crRNA te cijepanje kolateralnih RNA na kojima se nalaze molekule reporteri. Preuzeto i obrađeno iz rada (65).

Brza aktivnost cijepanja proteinom Cas13 može se koristiti za detekciju signala molekule ili entiteta od interesa od samo 100 000 molekula u reakcijskoj otopini, što je ekvivalentno femtomolarnoj koncentraciji u uzorku od jednog mikrolitara. Detekcija temeljena na Cas13 je vrlo specifična i može se podesiti za razlikovanje promjena u jednom nukleotidu na bilo kojem položaju na ciljnoj molekuli (75).

3.3.2. SHERLOCKv2

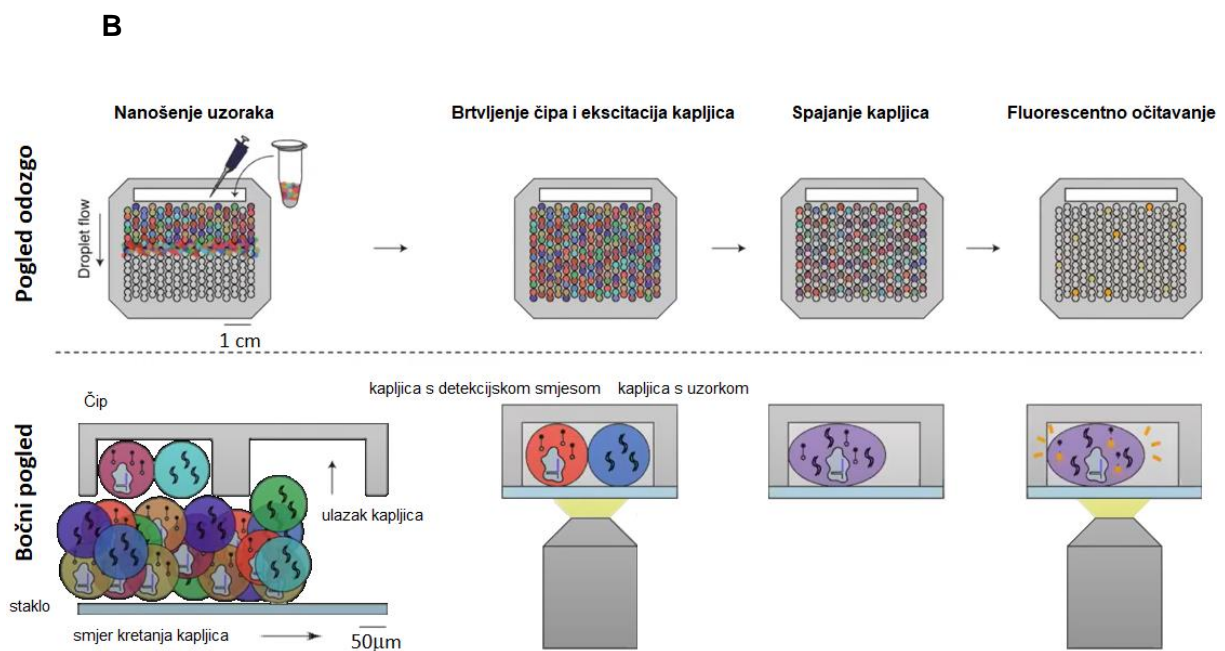
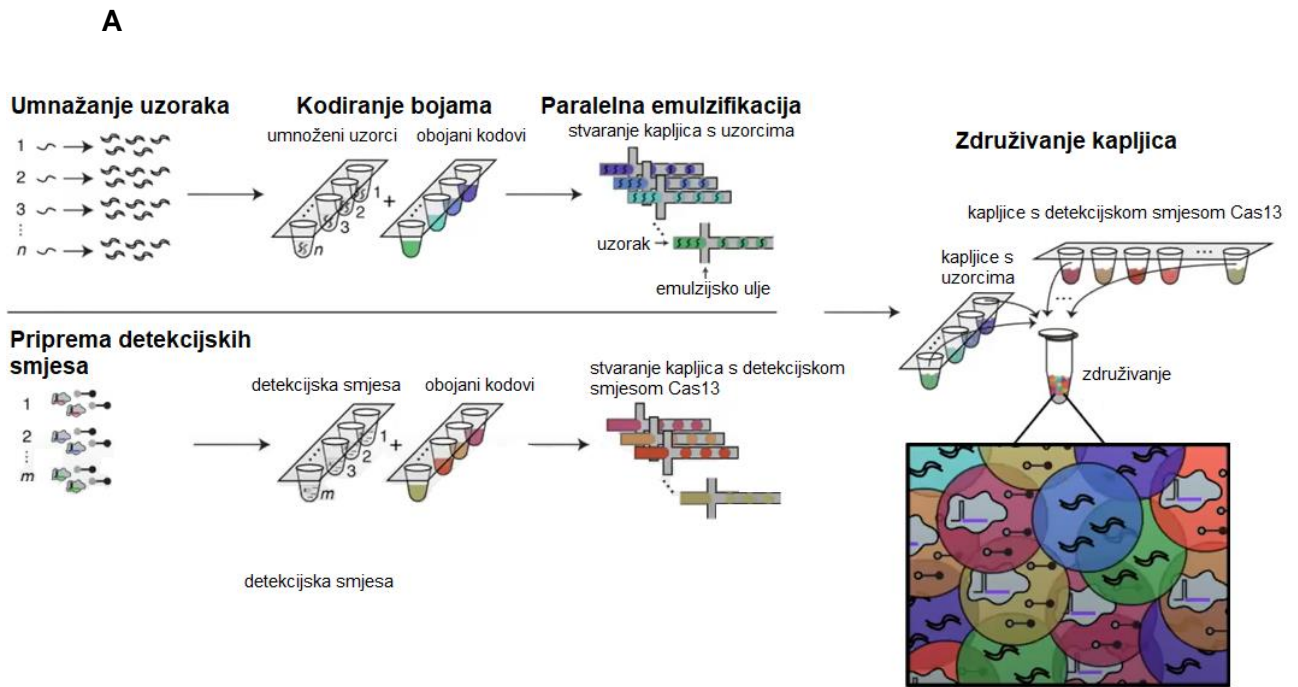
Prilikom eksperimentiranja i optimizacije metode SHERLOCK, pokazalo se da metoda ima jedan nedostatak; SHERLOCK je kvalitativna metoda, a ne kvantitativna. Godinu dana nakon predstavljanja, isti autori predstavili su poboljšanu verziju i nazvali je SHERLOCKv2. Metoda SHERLOCKv2 omogućava multipleksiranje budući da koristi Cas13 proteine iz različitih organizama, točnije LwaCas13a (*L. wadei*), CcaCas13b (*Apnoctophaga canimorsus*

Cc5), LbaCas13a (L. bakterija [soj NK4A179]), i PsmCas13b (*Prevotella* sp. MA2016). Ovi različiti ortolozi proteina Cas13 pokazuju tipično cijepanje ciljne RNA ali i kolateralno cijepanje susjednih RNA na točno određenim dinukleotidnim mjestima poput AU, UC, AC i GA. Ovo svojstvo omogućuje dizajniranje fluorescentno obilježenih proba koja prepoznaju dinukleotidna mjesta i na temelju otpuštanja fluorescentnog signala razlučuju o kojem se entitetu radi. Shodno tome, metoda SHERLOCKv2 omogućila je detekciju do 4 različita entiteta ili molekule od interesa. Uz mogućnost multipleksiranja SHERLOCKv2 je također unaprijeđen da kvalitativno detektira uzorke u atomolarnim pa sve to zeptomolarnih količina te da rezultati pokazuju jaku korelaciju između intenziteta signala i koncentracije ciljne molekule (75).

3.3.3. CARMEN

Tehnologija metode CARMEN temelji se na samoorganizaciji nanolitarskih kapljica koje sadrže CRISPR/Cas detekcijske reagense koje se slažu u formaciju nalik mikročipovima (engl. *microwell array*) (82). Metoda je razvijena 2020. godine kao metoda za široku detekciju različitih multipleksiranih ciljnih nukleinskih kiselina te njezino ime dolazi od opisa metode na engleskom jeziku koje glasi *Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids*. Metoda CARMEN za razliku od ostalih metoda baziranih na CRISPR/Cas sustavima koje uglavnom koriste mikrolitarske volumene u svojim reakcijama, koristi nanolitarske volumene i temelji svoj mehanizam na samoorganizaciji reakcijske smjese, čime se postiže mogućnost za multipleksiranje i testiranje ogromnog broja ciljnih molekula. Metoda CARMEN opisuje se kao metoda visoke protočnosti uzoraka (engl. *high throughput*) čime se omogućava paralelno testiranje 4500 i više različitih entiteta u svega nekoliko minuta. Metoda započinje izolacijom nukleinskih kiselina i multipleks PCR umnažanjem za različite ciljne molekule u uzorku, dok se paralelno s tim odvija priprema detekcijskih smjesa napravljena od proteina Cas13 i različitih crRNA s vođenjem cijepanja na različite virusne i bakterijske entitete. Svakom uzorku i svakoj detekcijskoj smjesi dodaje se jedinstvena smjesa fluorescentno obilježenih molekula reportera koju još zovemo obojeni kod (engl. *color code*). Međusobne

kombinacije i omjeri unutar fluorescentnih molekula reportera, odnosno obojenog koda omogućavaju kreiranje do 1050 jedinstvenih boja odnosno kodova koje se mogu detektirati pomoću analizatora. Sve smjese uzoraka i reagensa se emulzificiraju u nanolitarske kapljice i spajaju zajedno u jednu reakcijsku tubicu pri čemu inicijalno ne dolazi do međusobne interakcije uzoraka i njihovih odgovarajućih reagensa u nanolitarskim kapljicama. Svrha ovakvog miješanja svih uzoraka i svih reakcijskih smjesa je kreiranje brojnih kombinacija i stvaranje različitih parova kapljica uzoraka i reakcijskih smjesa. Čitav sadržaj reakcijske tubice koja sadrži sve moguće generirane kapljice stavlja se u mikročip veličine nekoliko centimetara koji na svojoj površini sadrži tisuće mikrometarskih jažica koje se nasumičnim kombinacijama pune s po dvije kapljice. Fluorescentnom mikroskopijom i korištenjem naprednih optičkih alata jažice se pregledavaju i očitava se fluorescentni signal kako bi se saznao postojeći položaj i kombinacija nasumično raspoređenih kapljica. Primjenom električnog impulsa, dolazi do pucanja membrane kapljica te međusobnog spajanja sadržaja dviju kapljica u jednu što dovodi do spajanja Cas13 – crRNA kompleksa s molekulama iz uzorka. U onim kapljicama u kojima je došlo do kontakta proteina Cas13 i ciljne molekule, doći će to kolateralnog cijepanja fluorescentnih proba i pojave svjetlosnog signala, koji direktno odgovara prisutnosti testiranog entiteta u uzorku. Primjenom metode CARMEN moguće je kreirati panele za detekciju gotovo svih virusa koji napadaju čovjeka te njihovih podtipova i mutanata rezistentnih na različite lijekove. Zabilježena je i mogućnost detekcije različitih SNP polimorfizama kao i kod velikog broja drugih CRISPR baziranih metoda (83). Analiza osjetljivosti metode CARMEN na primjeru detekcije virusa Zike (ZIKV) pokazala je mogućnost detekcije 1 kopije gena u mikrolitru uzorka, što odgovara koncentraciji detekcije od 10^{-18} M (75). Grafički prikaz metodologije CARMEN nalazi se na slici 12.



Slika 12. Grafički prikaz metodologije CARMEN. **A)** Uzorci i reakcijske smjese koje sadrže kompleks Cas13-crRNA u paralelnim se koracima miješaju s fluorescentnim bojama kodovima. Nakon procesa emulzifikacije i stvaranja kapljica, kapljice koje sadrže uzorke i kapljice koje sadrže reakciju smjesu združuju se u jednu reakciju tubicu. **B)** Sadržaj reakcijske smjese sa združenim kapljicama nanosi se na čip čije su jažice dizajnirane za nasumičan ulazak samo dvije kapljice. Fluorescencija se mjeri prije i poslije izbijanja električnog impulsa koji dvije kapljice spaja u jednu te tako uzrokuje cijepanje ciljnih i kolateralnih molekula RNA. Preuzeto i obrađeno iz rada (83).

4. Rasprava

4. Rasprava

Od svoje prve *in vitro* primjene 2012. godine pa sve do danas, metodologija temeljena na sustavima CRISPR/Cas doživjela je strelovit razvoj i široku primjenu u brojnim granama biomedicine. Svojstvo sustava CRISPR/Cas da precizno cijepaju ciljnu molekulu DNA istraživačima je poslužilo da od jednostavnih uvođenja delecija i insercija na ciljnim molekulama DNA stvore složene i napredne alate za gensko uređivanje i gensku terapiju te razviju precizne, osjetljive i brze detekcijske metode za primjenu u molekularnoj dijagnostici (67). Dijagnostičke metode temeljene na sustavima CRISPR/Cas za razliku od primjene sustava CRISPR/Cas u terapijske svrhe ili svrhe genskog uređivanja ne uključuju promjene na ciljnim molekulama DNA ili RNA te samim time nisu podložne etičkim raspravama ili preprekama. Ukoliko dijagnostičke platforme temeljene na sustavima CRISPR/Cas zadovolje kriterije za dovoljno osjetljivu i specifičnu detekciju entiteta ili molekula od interesa, uvođenje ove metodologije u komercijalnu i rutinsku primjenu trebalo bi proći bez većih tehničkih, regulatornih ili etičkih prepreka (84).

Metoda *real-time* PCR široko je korištena metoda u molekularnoj dijagnostici koja je s vremenom postala zlatni standard za detekciju i kvantifikaciju različitih zaraznih, nasljednih te metaboličkih bolesti, koja pruža visoko osjetljivu i specifičnu identifikaciju uzročnika ili uzročnih promjena u genetičkom materijalu za spomenute tipove bolesti. Premda se testovi temeljeni na metodi *real-time* PCR smatraju najosjetljivijima i najspecifičnijima, korištenje ove metode zahtijeva brojne korake izolacije i prepreme uzoraka te korištenje posebnog laboratorijskog prostora uz upotrebu velikog broja popratne laboratorijske instrumentacije, od kojih je najvažniji sam *real-time* PCR analizator koji je zbog svoje visoke cijene još uvijek teško dobavljen za laboratorije s ograničenim financijskim sredstvima, što se posebno odnosi na laboratorije u nerazvijenim zemljama ili zemljama u razvoju. U jeku pandemije Covid-19 kojoj trenutno svjedočimo, pokazalo se kako je ključni čimbenik u sprečavanju i usporavanju širenja virusa koji prijete globalnom zdravlju rano i brzo otkrivanje zaraze čime se omogućuje trenutno djelovanje koje uključuje izoliranje zaraženih osoba te brzo pružanje zdravstvene skrbi. Na

samom početku pandemije Covid-19, donesene su smjernice za testiranje na virus SARS-CoV-2 te je kao glavna dijagnostička metoda od strane krovnih organizacija poput Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) bila predložena metoda *real-time* PCR kojom se provodi testiranje na 3 virusna gena; gen E, koji kodira za proteine virusne kapside, gen N koji kodira za proteine ribonukleokapside i gen RdRP koji kodira za RNA-ovisnu RNA polimerazu. Budući da na samom početku pandemije nisu postojali multipleks kompleti koji bi odjednom testirali sva tri gena u jednoj reakciji, testiranje metodom *real-time* PCR iziskivalo je uzastopno testiranje na svaki od tri gena, čime se od uzimanja uzorka do konačnih rezultata čekalo po više sati (85). Upravo je globalna potražnja za masovnim *real-time* PCR testiranjem te proizvodnjom popratne instrumentacije i detekcijskih kompleta uzrokovala zagušenost sustava primjenom jedne metode za detekciju i uvelike pridonijela ubrzanom razvoju metodologije CRISPR/Cas u dijagnostičke svrhe kako bi se nastavila globalna borba protiv virusa SARS-CoV-2. Evaluacije dijagnostičkih testova temeljenih na metodologiji CRISPR/Cas pokazale su visoku osjetljivost i specifičnost detekcije koja se u potpunosti može usporediti s onom metode *real-time* PCR. Metodologija CRISPR/Cas omogućuje izravno testiranje iz primarnih uzoraka, međutim za dobivanje rezultata koji bi zadovoljili detekciju pri izrazito niskim femtomolarnim (10^{-15} M) i atomolarnim (10^{-18} M) koncentracijama nukleinskih kiselina iz primarnih uzoraka, metodologiju je potrebno koristiti u kombinaciji s drugim metodama umnažanja poput izotermalnog RPA ili LAMP umnažanja (75), budući da korištenje metodologije CRISPR/Cas bez koraka umnažanja može postići detekciju ciljnih molekula pri pikomolarnim koncentracijama (10^{-12} M) (86). Kao što samo ime sugerira, metode izotermalnih umnažanja odvijaju se na jednoj konstantnoj temperaturi i ne zahtijevaju korištenje skupe instrumentacije što drastično snižava troškove izvođenja dijagnostičkih testova baziranih na metodologiji CRISPR/Cas. Vizualizacija rezultata detekcije također se odvija putem ekonomičnih imunokromatografskih testova ili čitača fluorescencije te dodatno može biti udružena sa softverskom analizom kako bi se spriječilo subjektivno tumačenje rezultata. Za metodologiju CRISPR/Cas možemo reći da zadovoljava nekoliko važnih karakteristika: 1) metodologija CRISPR/Cas može se implementirati za

korištenje kao reakcija u jednom koraku (engl. *single reaction*); 2) metodologija omogućuje korištenje liofiliziranih proba i početnica što eliminira potrebu za dodatnim troškovima prijevoza robe pri posebnim temperaturnim režimima; 3) kratko vrijeme izvođenja testa; 4) fleksibilnost u izradi dijagnostičkog testa i mogućnost dizajniranja različitih crRNA za prepoznavanje ciljnih sekvenci različitih entiteta unutar nekoliko dana; 5) korištenje testova ne zahtijeva skupu instrumentaciju; 6) detekcija iz kliničkih uzoraka te 7) imunokromatografsko ili fluorescencijsko očitavanje rezultata. Nabrojane karakteristike izuzetno pogoduju razvoju metodologije CRISPR/Cas u dijagnostičke platforme koje bi se prema svojem opisu i karakteristikama mogle upotrebljavati kao metode brze dijagnostike (engl. *rapid diagnostics*) ili metode dijagnosticiranja na mjestu pružanja zdravstvene skrbi (engl. *point-of-care diagnostics*) (87).

Metodologija CRISPR-Chip opisana u poglavlju metoda i materijala, budući da koristi imobilizirane proteine Cas9 na grafenskom tranzistoru male veličine koji je spojen na elektronički čitač te omogućava detekciju niskih koncentracija ciljnih molekula bez prethodnog umnažanja, izvanredan je primjer metodologije koja se u bliskoj budućnosti može razviti u prijenosni *point-of-care* dijagnostički instrument veličine ljudske ruke. Metodologije opisane u ovom radu predstavljaju trenutno najrazvijenije i najosjetljivije CRISPR/Cas alate kojima se mogu detektirati ciljne molekule pri izrazito niskim koncentracijama, od kojih metoda SHERLOCKv2 pokazuje najveću osjetljivost pri zeptomolarnim količinama koncentracije ciljne molekule (10^{-21} M). Sistematični pregled opisanih metoda i njihovih karakteristika nalazi se u tablici 1. Prvi komercijalni kompleti temeljeni na CRISPR/Cas sustavima već su dostupni i odobreni od krovnih organizacija poput Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) te nose IVD oznaku (engl. *in vitro diagnostics*). Primjer jednog takvog kompleta jest SHERLOCK™ CRISPR SARS-CoV-2 kit proizvođača Sherlock Biosciences, koji svoj mehanizam temelji na metodi SHERLOCK u kojoj se prepoznavanje virusnih gena *ORF1ab* i gena *N* te interne kontrole gena *RnaseP* odvija pomoću posebno dizajniranih molekula crRNA te se čitava reakcija zbiva pri izotermalnom umnažanju kojem prethodi reverzna transkripcija. Rezultati reakcije očitavaju se na konvencionalnom čitaču fluorescencije uz očitavanje fluorescencije na 530 nm (FAM) (75).

Tablica 1. Sistematični prikaz metodologije CRISPR/Cas sustava klase 2 u dijagnostici te njihove glavne karakteristike. Preuzeto i obrađeno iz rada (75).

Tip CRISPR/Cas sustava	Metoda	Protein	Ciljna molekula	Umnažanje	Metoda detekcije	Modelni organizam ili molekula	Osjetljivost
II. tip	CRISPR-Chip	Cas9	DNA	nema	potencijometrija	SNP polimorfizmi	1.7×10^{-15} M
V. tip	DETECTR	Cas12a	DNA	RPA	fluorescencija imunokromatog rafija	HPV 16 / HPV18	1×10^{-18} M
	HOLMES	Cas12a	DNA, RNA	PCR	fluorescencija	JEV	1×10^{-17} M
	HOLMES v2	Cas12b	DNA	LAMP	fluorescencija	JEV	1×10^{-17} M
	STOP Covid	AapCas 12a	RNA	RT-LAMP	fluorescencija imunokromatog rafija	SARS-CoV-2	100 kopija/ml
	SHERLOCK	Cas13a	DNA, RNA	RPA	fluorescencija	virusi, bakterije SNP polimorfizmi	2×10^{-18} M
VI. tip	SHERLOCK v2	Cas13	DNA, RNA	RPA	fluorescencija imunokromatog rafija	virusi, bakterije	8×10^{-21} M
	CARMEN	LwCas 13a	DNA, RNA	PCR ili RPA	fluorescencija	virusi	1×10^{-18} M

Najveći izazovi metodologije CRISPR/Cas i prostor za poboljšanje u revolucionaran dijagnostički alat, najviše se odnosi na korake izolacije nukleinskih kiselina iz uzorka, pripreme reagenasa te samo umnažanje ciljnih molekula (84). Često se u izradi dijagnostičkih testova zanemaruje potreba za jednostavnim korakom pripreme uzoraka DNA ili RNA kojim bi se omogućilo izravno dodavanje kvalitetnih izolata u reakciju s CRISPR/Cas-crRNA kompleksom kako bi se održao jednostavan protokol rada za testiranje. Izbor odgovarajućeg tipa uzorka

ovisit će o tome koji je uzorak klinički najznačajniji i minimalno invazivan za pacijenta, što ponekad ne mora pogodovati optimizaciji i validaciji dijagnostičkog testa. Budući da je izolacija nukleinskih kiselina prvi korak svakog molekularno-dijagnostičkog testa, nedovoljno kvalitetno izvedena izolacija iz uzorka uvelike utječe na konačan ishod rezultata dijagnostičkog testa, posebice ako se radi o entitetima koji mogu imati nizak titar, kao što je to slučaj kod virusa HIV-1 (88). Klinički uzorci često sadrže brojne inhibitore koji onemogućuju pravilno izvođenje nekog od koraka za izvedbu dijagnostičkog testa pa je u procesu izolacije bitno uvesti korak uklanjanja inhibitora. Dizajn proba i početnica te priprema reagensa i reakcijske smjese također mogu uvelike utjecati na ishod dijagnostičkog testa. Ukoliko početnice imaju pogrešku u svom dizajnu, može doći do stvaranja dimera početnica (engl. *primer-dimer*) te do nespecifičnog umnažanja ne-ciljnih molekula što uzrokuje lažno pozitivne rezultate i smanjenje specifičnosti testa (84). Ukoliko se laboratorijski djelatnici ne pridržavaju mjera predostrožnosti, moguća je pojava kontaminacije prostora i samih reagensa, čime izvođenje dijagnostičkog testa postaje otežano ili posve onemogućeno. Eventualni problemi mogu se pojaviti tijekom izvođenja reakcije umnažanja, pri čemu može doći do pojave unakrsne kontaminacije uzoraka (engl. *cross contamination*) (84).

Iako dijagnostičke metode temeljene na sustavima CRISPR/Cas već sada pokazuju izvanredne rezultate u usporedbi s drugim standardnim metodama molekularne dijagnostike poput metode *real-time* PCR, dodatno pojednostavljenje upotrebe kemikalija i reakcijskih smjesa za detekciju pokazalo bi se revolucionarno za molekularnu dijagnostiku, posebice ako bi se reakcija mogla izvoditi u svega nekoliko minuta na sobnoj temperaturi bez složene ili skupe opreme. Poboljšanja u CRISPR/Cas dijagnostičkim testovima mogu se postići identifikacijom ili genetičkim inženjeringom novih proteina Cas koji bi pokazivali enzimsku aktivnost pri nižim temperaturama, imali veću osjetljivost ili bržu enzimsku kinetiku, što bi omogućilo još bržu i jednostavniju detekciju ciljnih molekula bez upotrebe metoda umnažanja. Uz to, korištenjem multipleksiranja kao što je to pokazano kod primjerice metoda SHERLOCKv2 ili CARMEN omogućila bi se izrada dijagnostičkih panela čime bi se stvorila

mogućnost testiranja na širok spektar uzročnika bolesti i dobivanje velikog broja rezultata iz samo jedne reakcije (86). Na konkretnom primjeru, time bi se omogućilo da se kreiraju paneli za rezistenciju virusnih i bakterijskih sojeva na gotovo sve dostupne i poznate antivirusne lijekove ili antibiotike. Kako se s vremenom postižu ovi pomaci, gotovo sa sigurnošću možemo reći da će daljnji razvoj metodologije CRISPR/Cas i njezina primjena u dijagnostici te drugim granama biomedicine imati dalekosežan učinak na ljudsko društvo i zdravlje te da bi u sljedećim godinama dijagnostički testovi temeljeni na CRISPR/Cas metodologiji mogli postati uobičajeni u rutinskoj kliničkoj upotrebi i upotrebi kod kuće te na taj način u potpunosti promijeniti dijagnosticiranje bolesti.

5. Zaključci

5. Zaključci

Metodologija CRISPR/Cas doživljava strelovit razvoj u pouzdane dijagnostičke platforme visoke osjetljivosti i specifičnosti za kliničku upotrebu, čiji je razvoj najviše ubrzala pojava globalne pandemije uzrokovana virusom SARS-CoV-2 zbog globalne potrebe za testiranjem velikog broja ljudi.

Metode opisane u ovom radu predstavljaju najrazvijenije dijagnostičke metode temeljene na sustavima CRISPR/Cas koje mogu detektirati iznimno niske koncentracije ciljnih molekula DNA i RNA (do 10^{-21} M) i time pružiti alternativu dijagnostičkom testiranju putem metode *real-time* PCR za različite bolesti.

Metodologija CRISPR/Cas pogodna je za primjenu u laboratorijima ili dijelovima svijeta s ograničenim resursima te za razvoj prijenosnih dijagnostičkih instrumenata i testova za testiranje na mjestu pružanja zdravstvene skrbi (engl. *point-of-care testing*).

Potruga za novim ortolozima proteina Cas i pronalazak onih proteina koji pokazuju aktivnost na nižim temperaturama te veću osjetljivost i specifičnost za ciljne molekule DNA i RNA omogućit će izradu novih ili poboljšanih dijagnostičkih metoda i platformi temeljenih na sustavima CRISPR/Cas.

6. Literatura

6. Literatura

1. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet.* 2010;11(3):181-190. doi:10.1038/nrg2749
2. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315(5819):1709-1712. doi:10.1126/science.1138140
3. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W52-7. doi:10.1093/nar/gkm360
4. van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(7):479-492. doi:10.1038/nrmicro3279
5. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429-5433. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
6. Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *J Bacteriol.* 2018;200(7). doi:10.1128/JB.00580-17
7. Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell.* 2014;54(2):234-244. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.011
8. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005;60(2):174-182. doi:10.1007/s00239-004-0046-3
9. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(6):467-477. doi:10.1038/nrmicro2577
10. Pickar-Oliver A, Gersbach CA. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(8):490-507. doi:10.1038/s41580-019-0131-5
11. Islam KU, Iqbal J. An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:560616. doi:10.3389/fcimb.2020.560616
12. Piergentili R, Del Rio A, Signore F, Umani Ronchi F, Marinelli E, Zaami S. CRISPR-Cas and Its Wide-Ranging Applications: From Human Genome Editing to Environmental Implications, Technical Limitations, Hazards and Bioethical Issues. *Cells.* 2021;10(5). doi:10.3390/cells10050969
13. Makarova KS, Wolf YI, Koonin E V. The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(6):1392-1400. doi:10.1042/BST20130038
14. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(11):722-736. doi:10.1038/nrmicro3569

15. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*. 2018;172(6):1239-1259. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.032
16. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(2):67-83. doi:10.1038/s41579-019-0299-x
17. Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin E V. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(10):6091-6105. doi:10.1093/nar/gku241
18. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471(7340):602-607. doi:10.1038/nature09886
19. Shmakov S, Smargon A, Scott D, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(3):169-182. doi:10.1038/nrmicro.2016.184
20. Fonfara I, Richter H, Bratovič M, Le Rhun A, Charpentier E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*. 2016;532(7600):517-521. doi:10.1038/nature17945
21. Koonin E V, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*. 2017;37:67-78. doi:10.1016/j.mib.2017.05.008
22. Strecker J, Jones S, Koopal B, et al. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nat Commun*. 2019;10(1):212. doi:10.1038/s41467-018-08224-4
23. Swarts DC, Jinek M. Mechanistic Insights into the cis- and trans-Acting DNase Activities of Cas12a. *Mol Cell*. 2019;73(3):589-600.e4. doi:10.1016/j.molcel.2018.11.021
24. Meeske AJ, Nakandakari-Higa S, Marraffini LA. Cas13-induced cellular dormancy prevents the rise of CRISPR-resistant bacteriophage. *Nature*. 2019;570(7760):241-245. doi:10.1038/s41586-019-1257-5
25. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935-949. doi:10.1016/j.cell.2014.02.001
26. Jiang F, Taylor DW, Chen JS, et al. Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science*. 2016;351(6275):867-871. doi:10.1126/science.aad8282
27. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015;163(3):759-771. doi:10.1016/j.cell.2015.09.038
28. Dong D, Ren K, Qiu X, et al. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. *Nature*. 2016;532(7600):522-526. doi:10.1038/nature17944
29. Gao P, Yang H, Rajashankar KR, Huang Z, Patel DJ. Type V CRISPR-Cas Cpf1 endonuclease employs a unique mechanism for crRNA-mediated target DNA recognition. *Cell Res*. 2016;26(8):901-913. doi:10.1038/cr.2016.88
30. Li S-Y, Cheng Q-X, Liu J-K, Nie X-Q, Zhao G-P, Wang J. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA. *Cell Res*. 2018;28(4):491-493. doi:10.1038/s41422-018-0022-x

31. Anantharaman V, Makarova KS, Burroughs AM, Koonin E V, Aravind L. Comprehensive analysis of the HEPN superfamily: identification of novel roles in intra-genomic conflicts, defense, pathogenesis and RNA processing. *Biol Direct.* 2013;8(1):15. doi:10.1186/1745-6150-8-15
32. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science.* 2016;353(6299):aaf5573. doi:10.1126/science.aaf5573
33. Liu L, Li X, Wang J, et al. Two Distant Catalytic Sites Are Responsible for C2c2 RNase Activities. *Cell.* 2017;168(1-2):121-134.e12. doi:10.1016/j.cell.2016.12.031
34. Liu L, Li X, Ma J, et al. The Molecular Architecture for RNA-Guided RNA Cleavage by Cas13a. *Cell.* 2017;170(4):714-726.e10. doi:10.1016/j.cell.2017.06.050
35. Mojica FJ, Díez-Villaseñor 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(1):244-246. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x
36. Jansen R, Embden JDA van, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1565-1575. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
37. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 2005;151(Pt 8):2551-2561. doi:10.1099/mic.0.28048-0
38. 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. doi:10.1126/science.1225829
39. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(39):E2579 LP-E2586. doi:10.1073/pnas.1208507109
40. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2015;6:6244. doi:10.1038/ncomms7244
41. Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell.* 2015;6(5):363-372. doi:10.1007/s13238-015-0153-5
42. El Ouar I, Djekoun A. Therapeutic and diagnostic relevance of Crispr technology. *Biomed Pharmacother.* 2021;138:111487. doi:10.1016/j.biopha.2021.111487
43. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339(6121):819-823. doi:10.1126/science.1231143
44. Wang T, Zhang H, Zhu H. CRISPR technology is revolutionizing the improvement of tomato and other fruit crops. *Hortic Res.* 2019;6(1):77. doi:10.1038/s41438-019-0159-x

45. Erpen-Dalla Corte L, M Mahmoud L, S Moraes T, Mou Z, W Grosser J, Dutt M. Development of Improved Fruit, Vegetable, and Ornamental Crops Using the CRISPR/Cas9 Genome Editing Technique. *Plants (Basel, Switzerland)*. 2019;8(12). doi:10.3390/plants8120601
46. Cyranoski D. Gene-edited “micropigs” to be sold as pets at Chinese institute. *Nature*. 2015;526(7571):18. doi:10.1038/nature.2015.18448
47. Sugano S, Hirose A, Kanazashi Y, et al. Simultaneous induction of mutant alleles of two allergenic genes in soybean by using site-directed mutagenesis. *BMC Plant Biol*. 2020;20(1):513. doi:10.1186/s12870-020-02708-6
48. Jouanin A, Gilissen LJWJ, Schaart JG, et al. CRISPR/Cas9 Gene Editing of Gluten in Wheat to Reduce Gluten Content and Exposure—Reviewing Methods to Screen for Coeliac Safety. *Front Nutr*. 2020;7:51. doi:10.3389/fnut.2020.00051
49. Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna C V, et al. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J*. 2018;16(4):902-910. doi:10.1111/pbi.12837
50. Zhou W, Wan Y, Guo R, et al. Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186056. doi:10.1371/journal.pone.0186056
51. Mukae T, Yoshii K, Watanobe T, Tagami T, Oishi I. Production and characterization of eggs from hens with ovomucoid gene mutation. *Poult Sci*. 2021;100(2):452-460. doi:https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.026
52. Khwatenge CN, Nahashon SN. Recent Advances in the Application of CRISPR/Cas9 Gene Editing System in Poultry Species. *Front Genet*. 2021;12:627714. doi:10.3389/fgene.2021.627714
53. Cowan PJ, Hawthorne WJ, Nottle MB. Xenogeneic transplantation and tolerance in the era of CRISPR-Cas9. *Curr Opin Organ Transplant*. 2019;24(1):5-11. doi:10.1097/MOT.0000000000000589
54. Naeimi Kararoudi M, Hejazi SS, Elmas E, et al. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 Gene Editing Technique in Xenotransplantation. *Front Immunol*. 2018;9:1711. doi:10.3389/fimmu.2018.01711
55. Li-Juan GELX-J and J, Torres-Ruiz R, Rodriguez-Perales S. CRISPR-Cas9 technology: applications and human disease modelling. *Brief Funct Genomics*. 2017;16(1):4-12. doi:10.1093/bfgp/elw025
56. Alagoz M, Kherad N. Advance genome editing technologies in the treatment of human diseases: CRISPR therapy (Review). *Int J Mol Med*. 2020;46(2):521-534. doi:10.3892/ijmm.2020.4609
57. Giau V Van, Lee H, Shim KH, Bagyinszky E, An SSA. Genome-editing applications of CRISPR-Cas9 to promote in vitro studies of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*. 2018;13:221-233. doi:10.2147/CIA.S155145
58. Safari F, Hatam G, Behbahani AB, et al. CRISPR System: A High-throughput Toolbox for Research and Treatment of Parkinson's Disease. *Cell Mol Neurobiol*. 2020;40(4):477-493. doi:10.1007/s10571-019-00761-w
59. Vermersch E, Jouve C, Hulot J-S. CRISPR/Cas9 gene-editing strategies in cardiovascular cells. *Cardiovasc Res*. 2020;116(5):894-907. doi:10.1093/cvr/cvz250

60. Sharma G, Sharma AR, Bhattacharya M, Lee S-S, Chakraborty C. CRISPR-Cas9: A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of Human Diseases. *Mol Ther.* 2021;29(2):571-586. doi:10.1016/j.ymthe.2020.09.028
61. Karimian A, Gorjizadeh N, Alemi F, et al. CRISPR/Cas9 novel therapeutic road for the treatment of neurodegenerative diseases. *Life Sci.* 2020;259:118165. doi:10.1016/j.lfs.2020.118165
62. Zuo E, Huo X, Yao X, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted chromosome elimination. *Genome Biol.* 2017;18(1):224. doi:10.1186/s13059-017-1354-4
63. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *N Engl J Med.* 2021;384(3):252-260. doi:10.1056/NEJMoa2031054
64. Kaminski R, Bella R, Yin C, et al. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. *Gene Ther.* 2016;23(8-9):690-695. doi:10.1038/gt.2016.41
65. Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc.* 2019;14(10):2986-3012. doi:10.1038/s41596-019-0210-2
66. Yan F, Wang W, Zhang J. CRISPR-Cas12 and Cas13: the lesser known siblings of CRISPR-Cas9. *Cell Biol Toxicol.* 2019;35(6):489-492. doi:10.1007/s10565-019-09489-1
67. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med.* 2015;21(2):121-131. doi:10.1038/nm.3793
68. Bosley KS, Botchan M, Bredenoord AL, et al. CRISPR germline engineering--the community speaks. *Nat Biotechnol.* 2015;33(5):478-486. doi:10.1038/nbt.3227
69. Wang X, Shang X, Huang X. Next-generation pathogen diagnosis with CRISPR/Cas-based detection methods. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):1682-1691. doi:10.1080/22221751.2020.1793689
70. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science.* 2017;356(6336):438-442. doi:10.1126/science.aam9321
71. Tsou J-H, Leng Q, Jiang F. A CRISPR Test for Detection of Circulating Nuclei Acids. *Transl Oncol.* 2019;12(12):1566-1573. doi:10.1016/j.tranon.2019.08.011
72. Hajian R, Balderston S, Tran T, et al. Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nat Biomed Engl.* 2019;3(6):427-437. doi:10.1038/s41551-019-0371-x
73. Zhang Y, Qian L, Wei W, et al. Paired Design of dCas9 as a Systematic Platform for the Detection of Featured Nucleic Acid Sequences in Pathogenic Strains. *ACS Synth Biol.* 2017;6(2):211-216. doi:10.1021/acssynbio.6b00215
74. Zheng C, Huang L, Zhang H, Sun Z, Zhang Z, Zhang G-J. Fabrication of Ultrasensitive Field-Effect Transistor DNA Biosensors by a Directional Transfer Technique Based on CVD-Grown Graphene. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(31):16953-16959. doi:10.1021/acsami.5b03941
75. Kostyusheva A, Brezgin S, Babin Y, et al. CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases. *Methods.*

76. Chen JS, Ma E, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 2018;360(6387):436-439. doi:10.1126/science.aar6245
77. Li L, Li S, Wu N, et al. HOLMESv2: A CRISPR-Cas12b-Assisted Platform for Nucleic Acid Detection and DNA Methylation Quantitation. *ACS Synth Biol*. 2019;8(10):2228-2237. doi:10.1021/acssynbio.9b00209
78. Broughton JP, Deng X, Yu G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*. 2020;38(7):870-874. doi:10.1038/s41587-020-0513-4
79. Li S-Y, Cheng Q-X, Wang J-M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discov*. 2018;4(1):20. doi:10.1038/s41421-018-0028-z
80. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*. 2015;517(7534):321-326. doi:10.1038/nature14192
81. Joung J, Ladha A, Saito M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing. *N Engl J Med*. 2020;383(15):1492-1494. doi:10.1056/NEJMc2026172
82. Kulesa A, Kehe J, Hurtado JE, Tawde P, Blainey PC. Combinatorial drug discovery in nanoliter droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(26):6685-6690. doi:10.1073/pnas.1802233115
83. Ackerman CM, Myhrvold C, Thakku SG, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13. *Nature*. 2020;582(7811):277-282. doi:10.1038/s41586-020-2279-8
84. Lau A, Ren C, Lee LP. Critical review on where CRISPR meets molecular diagnostics. *Prog Biomed Engl*. 2020;3(1):12001. doi:10.1088/2516-1091/abbf5e
85. Sule WF, Oluwayelu DO. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects. *Pan Afr Med J*. 2020;35(Suppl 2):121. doi:10.11604/pamj.supp.2020.35.24258
86. Abudayyeh OO, Gootenberg JS. CRISPR diagnostics. *Science (80-)*. 2021;372(6545):914 LP - 915. doi:10.1126/science.abi9335
87. Chiu C. Cutting-Edge Infectious Disease Diagnostics with CRISPR. *Cell Host Microbe*. 2018;23(6):702-704. doi:10.1016/j.chom.2018.05.016
88. Dineva MA, MahiLum-Tapay L, Lee H. Sample preparation: a challenge in the development of point-of-care nucleic acid-based assays for resource-limited settings. *Analyst*. 2007;132(12):1193-1199. doi:10.1039/b705672a

7. Životopis