

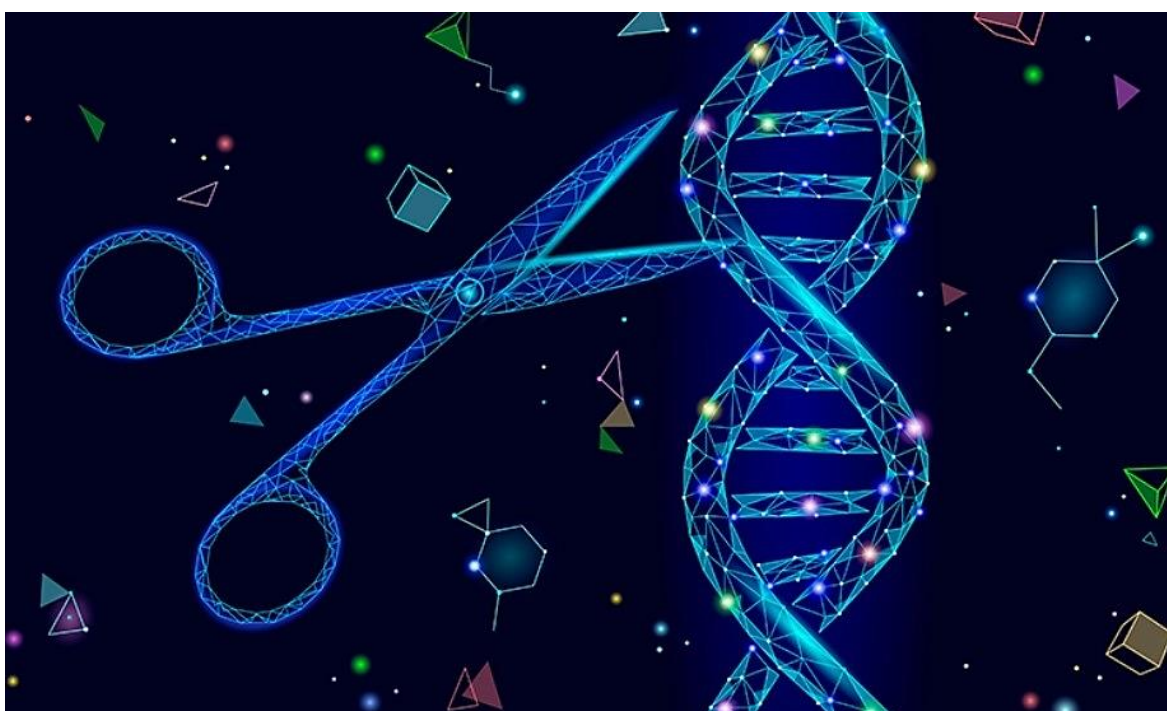


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Η χρήση της μεθόδου CRISPR/Cas9 στη θεραπευτική ανθρωπίνων νόσων**



Ονοματεπώνυμο Φοιτητή (ΑΜ)

**Ειρήνη Μαραντίδη (62117031)**

Ονοματεπώνυμο επιβλέποντα

**Δρ. Άννα Κολλιοπούλου**

**Αθήνα, 2021**

Πηγή εικόνας εξωφύλλου: <https://www.drugtargetreview.com/news/74139/nobel-prize-in-chemistry-awarded-to-scientists-who-discovered-crispr-cas9/>



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**  
**FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES**  
**DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES**  
Section of Medical Laboratories



DISSERTATION

**The use of the CRISPR/Cas9 method in the therapeutics of human diseases**



Student Name (CN)

**Eirini Marantidi (62117031)**

Name of Supervisor

**Dr. Anna Kolliopoulou**

**Athens, 2021**



## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- Άννα Κολλιοπούλου**      Ακαδημαϊκή Υπότροφος, Τμήμα Βιοϊατρικών  
Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων,  
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
- Απόστολος Μπελούκας**      Επίκουρος Καθηγητής και Διευθυντής του Εργαστηρίου  
Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα  
Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών  
Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
- Χρυσάνθη Βογιατζάκη**      Λέκτορας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας  
Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

## **EXAMINATION COMMITTEE MEMBERSHIP**

Anna Kolliopoulou	Academic Fellow, Department of Biomedical Sciences, Section of Medical Laboratories, University of West Attica
Apostolos Beloukas	Assistant Professor and Director of the Laboratory of Molecular Microbiology and Immunology, Department of Biomedical Sciences, Section of Medical Laboratories, University of West Attica
Chrysanthi Voyiatzaki	Lecturer, Department of Biomedical Sciences, Section of Medical Laboratories, University of West Attica

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα ΕΙΡΗΝΗ ΜΑΡΑΝΤΙΔΗ του ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ, με αριθμό μητρώου 62117031 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ του Τμήματος ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα



Ειρήνη Μαραντιδου





**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσά μου Δρ. Κολλιοπούλου Άννα για την ανάθεση της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας. Η καθοδήγηση και οι συμβουλές της ήταν πολύ βοηθητικές και κρίσιμες για την επιτυχή εκπόνηση της Διπλωματικής Εργασίας. Υπήρχε πάντα ανταπόκριση όποτε αντιμετώπιζα δυσκολία και θετική διάθεση για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την υπομονή της και πραγματικά χαίρομαι πολύ που συνεργαστήκαμε.

Φυσικά θέλω επίσης να ευχαριστήσω και τα αξιότιμα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής τον κ. Μπελούκα Απόστολο και την κα. Βογιατζάκη Χρυσάνθη. Είναι μεγάλη μου τιμή και χαρά που δέχθηκαν να αξιολογήσουν τη Διπλωματική μου Εργασία.

Ειρήνη Μαραντίδη

29/09/2021

## **ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

**AAVs:** Adeno-Associated Viruses, Αδένο-σχετιζόμενοι ιοί

**AIDS:** Acquired Immunodeficiency Syndrome, σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας

**AVs:** adenoviruses, αδενοϊοί

**AuNPs:** gold Nanoparticles, νανοσωματίδια χρυσού

**BH:** Bridge Helix, ελικοειδής γέφυρα

**BMD:** Becker Muscular Dystrophy, μυϊκή δυστροφία Becker

**CAR:** Chimeric Antigen Receptor, χιμαιρικός υποδοχέας αντιγόνου

**Cas9:** CRISPR-associated protein 9, πρωτεΐνη 9 που σχετίζεται με το σύστημα CRISPR

**cccDNA:** covalently closed circular DNA, ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό DNA

**CF:** Cystic Fibrosis, κυστική ίνωση

**CPPs:** Cell-Penetrating Peptides, πεπτίδια που διεισδύουν στα κύτταρα

**CRISPR:** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, Ομαδοποιημένες Κανονικά Κατανεμημένες Βραχείες Παλίνδρομες Επαναλήψεις

**crRNA:** CRISPR RNA, RNA της περιοχής CRISPR

**CTLA-4:** Cytotoxic T Lymphocyte-Associated protein 4, πρωτεΐνη 4 που σχετίζεται με τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα

**DGC:** Dystrophin-Glycoprotein Complex, σύμπλοκο δυστροφίνης-γλυκοπρωτεΐνης

**MD:** Myotonic Dystrophy, μυοτονική δυστροφία

**DMD:** Duchenne Muscular Dystrophy, μυϊκή δυστροφία Duchenne

**DNA:** Deoxyribonucleic Acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

**DSBs:** Double Strand Breaks, δίκλωνες θραύσεις

**EBNAs:** Epstein-Barr Nuclear Antigens, πυρηνικά αντιγόνα του ιού Epstein-Barr

**EBV:** Epstein-Barr Virus, ιός Epstein-Barr

**ESCs:** Embryonic Stem Cells, εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα

**EVs:** Extracellular Vesicles, εξωκυτταρικά κυστίδια

**FSHD:** Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy, Πρόσωπο-ώμο-βραχιόνιος μυϊκή δυστροφία

**ZFNs:** Zinc-Finger Nucleases, νουκλεάσες με δάκτυλο ψευδαργύρου

**GFP:** Green Fluorescent Protein, πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

**gRNA:** guide RNA, RNA-οδηγός

**GvHD:** Graft-versus-Host Disease, νόσος μοσχεύματος έναντι ξενιστή

**HAART:** Highly Active Retroviral Therapy, εξαιρετικά ενεργή αντιρετροϊκή θεραπεία

**HBV:** Hepatitis B Virus, ιός ηπατίτιδας B

**HCC:** Hepatocellular Carcinoma, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

**HDR:** Homology Directed Repair, εξαρτώμενος από την ομολογία μηχανισμός επιδιόρθωσης

**hESCs:** human Embryonic Stem Cells, ανθρώπινα εμβρυικά βλαστοκύτταρα

**HIV:** Human Immunodeficiency Virus, ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας

**HLA:** Human Leucocyte Antigen, αντιγόνο ανθρώπινων λευκοκυττάρων

**hPSCs:** human Pluripotent Stem Cells, ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα

**HPV:** Human Papillomavirus, ιός ανθρώπινων θηλωμάτων

**iap:** isoenzyme alkaline phosphatase, ισοένζυμο αλκαλικής φωσφατάσης

**INDELS:** Insertions and Deletions, ενθέσεις και απαλοιφές

**iPSCs:** induced Pluripotent Stem Cells, επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα

**JCV:** John Cunningham (JC) virus, ιός John Cunningham (JC)

**LGMD:** Limp-Girdle Muscular Dystrophy, μυϊκή δυστροφία άκρων-ζωνών

**LMP-1:** Latent Membrane Protein-1, πρωτεΐνη λανθάνουσας μεμβράνης 1

**LMP-2:** Latent Membrane Protein-2, πρωτεΐνη λανθάνουσας μεμβράνης 2

**LNPs:** Lipid-based Nanoparticles, νανοσωματίδια λιπιδίων

**LTRs:** Long Terminal Repeats, μακριές τερματικές επαναλήψεις

**LVs:** Lentiviruses, λεντοϊοί

**mAbs:** monoclonal Antibodies, μονοκλωνικά αντισώματα

**MD:** Muscular Dystrophy, μυϊκή δυστροφία

**MGEs:** Mobile Genetic Elements, κινητά γενετικά στοιχεία

**MNs:** Meganucleases, μεγανουκλεάσες

**mRNA:** messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA

**NHEJ:** Non-Homologous End Joining, μη ομόλογη σύνδεση ελεύθερων άκρων

**NLS:** Nuclear Localization Signal, σήμα πυρηνικού εντοπισμού

**ORF:** Open Reading Frame, ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης

**PAM:** Protospacer Adjacent Motif, παρακείμενο μοτίβο της πρωτο-διαχωριστικής αλληλουχίας

**PBMCs:** Peripheral Blood Mononuclear Cells, μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος

**PD-1:** Programmed Death cell protein 1, πρωτεΐνη 1 προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου

**PD-L1:** Programmed cell Death-Ligand 1, PD-L1, προσδέτης 1 προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου

**PEI:** Polyethylenimine, πολυαιθυλενιμίνη

**RNA:** ribonucleic acid, ριβονουκλεϊκό οξύ

**RNP:** ribonucleoprotein, ριβονουκλεοπρωτεϊνικό

**RVDs:** Repeat Variable Diresidues, επαναλαμβανόμενα μεταβλητά δι-κατάλοιπα

**SCID:** Severe Combined Immunodeficiency, σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια

**sgRNA:** single guide RNA, RNA-οδηγός μονού κλώνου

**SNVs:** Single-Nucleotide Variations, μονο-νουκλεοτιδικές παραλλαγές

**ssODN:** single-stranded Oligodeoxynucleotide, μονόκλωνο ολιγοδεοξυνουκλεοτίδιο

**TALENs:** Transcription Activator-Like Effector Nucleases, νουκλεάσες τελεστές που μοιάζουν με ενεργοποιητές μεταγραφής

**trugRNA:** truncated guide RNA, κολοβωμένο RNA-οδηγός

**VLPs:** Virus-Like Particles, ιόμορφα σωματίδια

**VSV-G:** Vesicular Stomatitis Virus-Glycoprotein, γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου του ιού της φουσαλιδώδους στοματίτιδας

**X-SCID:** X-linked Severe Combined Immunodeficiency, βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια συνδεόμενη με το χρωμόσωμα X



<b>Πίνακας περιεχομένων</b>	<b>EXAMINATION COMMITTEE MEMBERSHIP</b> .....	1
<b>ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....		2
FSHD: Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy, Πρόσωπο-ώμο-βραχιόνιος μυϊκή δυστροφία .....		7
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....		1
<b>1.1. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ: ΑΠΟ ΤΟΝ ΟΜΟΛΟΓΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΣΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ</b> .....		2
1.1.1. Ιστορική αναδρομή.....		2
1.1.1.1 Η διαδικασία της στόχευσης γονιδίων μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού .....		2
1.1.1.2 Οι θραύσεις της διπλής έλικας ως καινοτόμο εργαλείο .....		3
1.1.1.2.1 Δίκλωνες θραύσεις και ενδογενείς μηχανισμοί επιδιόρθωσης του κυττάρου .....		4
1.1.1.3 Οι νουκλεάσες ως εργαλεία γονιδιωματικής επεξεργασίας .....		5
1.1.1.3.1 Μεγανουκλεάσες (Meganucleases, MNs) .....		5
1.1.1.3.2 Νουκλεάσες με δάκτυλο ψευδαργύρου (Zinc finger nucleases, ZFNs).....		7
1.1.1.3.3 Νουκλεάσες-τελεστές τύπου TALEN (Transcription activator-like effector nucleases, TALENs) .....		9
1.1.1.3.4 Η ανακάλυψη του CRISPR .....		12
<b>ΣΤΟΧΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....		15
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....		18
2.1. Συστατικά στοιχεία του συστήματος CRISPR/Cas9 .....		19
2.1.1. Τα γονίδια <i>Cas</i> που σχετίζονται με το σύστημα CRISPR (CRISPR-associated <i>Cas</i> genes) ..		19
2.1.2. Το ένζυμο Cas9.....		19
2.1.3. Λοιπά συστατικά του συστήματος CRISPR .....		21
2.2. Η σύσταση μιας περιοχής CRISPR .....		22
2.3. Ταξινόμηση του συστήματος CRISPR/Cas.....		24
2.4. Πρωτεΐνες Cas .....		25
2.5. Στάδια δράσης κατά το μηχανισμό του συστήματος CRISPR/Cas.....		26
2.5.1 Ενσωμάτωση των διαχωριστικών αλληλουχιών CRISPR/Cas .....		26
2.5.2 Έκφραση και ωρίμανση του συστήματος CRISPR/Cas.....		27
2.5.3. Παρεμβολή του συστήματος CRISPR/Cas .....		27
2.6. Γονιδιωματική επεξεργασία με το σύστημα CRISPR/Cas9 τύπου II .....		28
2.7. Μέθοδοι παράδοσης του συστήματος CRISPR/Cas9 .....		33
2.7.1 Εισαγωγή.....		33
2.7.2. Ιικοί φορείς.....		36
2.7.2.1. Αδενο-σχετιζόμενοι ιοί (Adeno-Associated Viruses, AAVs).....		36
2.7.2.2. Λεντοϊοί (Lentiviruses, LVs).....		38



2.7.2.3. Αδενοϊοί (Adenoviruses, AVs) .....	39
2.7.3. Μη ιικοί φορείς.....	39
2.7.3.1. Φυσικές μέθοδοι.....	39
2.7.3.1.1. Μικροέγχυση.....	39
2.7.3.1.2. Ηλεκτροπόρωση (Electroporation) .....	40
2.7.3.1.2.3. Χημικές μέθοδοι .....	41
2.7.3.1.2.3.1. Νανοσωματίδια λιπιδίων (lipid-based nanoparticles, LNPs).....	41
2.7.3.1.2.3.2. Πεπτίδια που διεισδύουν στα κύτταρα (Cell-Penetrating Peptides, CPPs).....	42
2.7.3.1.2.3.3. Νανοσωματίδια χρυσού (Gold nanoparticles, AuNPs) .....	43
2.7.3.1.2.3.4. Εξωκυτταρικά κυστίδια.....	45
2.7.4. <i>In vivo</i> παράδοση έναντι <i>ex vivo</i> παράδοσης.....	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	50
3.1.1. Η θεραπευτική χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 ενάντια στον ιό ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV) .....	51
3.1.1.1. Η μάστιγα του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας .....	51
3.1.1.2. Βασικά χαρακτηριστικά του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας .....	52
3.1.1.3. Κύκλος μόλυνσης που ακολουθεί ο ιός HIV-1.....	53
3.1.1.4. Λανθάνουσα και ενεργή λοίμωξη.....	54
3.1.1.5. Το γονίδιο του φακέλου του HIV και οι συν-υποδοχείς.....	55
3.1.1.6 Θεραπευτικές anti-HIV στρατηγικές που βασίζονται στο σύστημα CRISPR/Cas9.....	56
3.1.1.6.1 Παρεμπόδιση της ιικής μόλυνσης .....	57
3.1.1.6.2. Παρεμπόδιση της αντιγραφής του ιού .....	58
3.1.1.6.3. Παρεμπόδιση προ της ιικής ενσωμάτωσης.....	60
3.1.1.7 Μελλοντικές προοπτικές χρήσης του συστήματος CRISPR/Cas9 στην anti-HIV θεραπεία .....	66
3.1.2 Η θεραπευτική χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 ενάντια στον καρκίνο .....	67
3.1.2.1 Γενικά για τον καρκίνο .....	67
3.1.2.2. Θεραπευτικές εφαρμογές.....	69
3.1.2.2.1. Ανοσοθεραπεία κατά του καρκίνου .....	69
3.1.2.2.2. Επεξεργασία (επι)γονιδιώματος καρκινικών κυττάρων .....	70
3.1.2.2.3. Εξάλειψη ή απενεργοποίηση των καρκινογόνων ιικών λοιμώξεων .....	72
3.1.3. Η θεραπευτική χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 ενάντια στις ιογενείς λοιμώξεις και τις ασθένειες που προκαλούν .....	73
3.1.3.1. Ιός ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papillomavirus, HPV).....	73
3.1.3.2. Ιός της ηπατίτιδας Β (Hepatitis B Virus, HBV) .....	75
3.1.3.3. Ιός Epstein-Barr (Epstein-Barr Virus, EBV) .....	76

3.1.3.4. Ανθρώπινος νευροτροπικός πολιοϊός, human neurotropic polyoma virus (JC virus, JCV) .....	77
3.1.4. Προοπτικές εφαρμογής του συστήματος CRISPR/Cas9 στη θεραπεία αιματολογικών διαταραχών .....	78
3.1.4.1. Β-θαλασσαιμία .....	79
3.1.4.2. Δρεπανοκυτταρική νόσος (Sickle cell disease, SCD) .....	80
3.1.4.3. Βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια συνδεόμενη με το χρωμόσωμα X (X-linked Severe Combined Immunodeficiency, X-SCID) .....	81
3.1.5. Προοπτικές εφαρμογής του συστήματος CRISPR/Cas9 στη θεραπεία μυϊκών δυστροφιών (Muscular Dystrophies, MDs).....	82
3.1.5.1. Μυϊκή δυστροφία Duchenne (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD) .....	84
3.1.5.1.1. Αιτιολογικός παράγοντας εμφάνισης της νόσου .....	84
3.1.5.2. Στρατηγικές επεξεργασίας του γονιδίου DMD με τη βοήθεια του συστήματος CRISPR/Cas9 .....	85
3.1.6. Προοπτικές εφαρμογής του συστήματος CRISPR/Cas9 στη θεραπεία των καρδιαγγειακών παθήσεων.....	88
3.1.7. Προοπτικές εφαρμογής του συστήματος CRISPR/Cas9 στη θεραπεία της κυστικής ίνωσης (Cystic Fibrosis, CF) .....	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	91
4.1. Προκλήσεις του συστήματος CRISPR-Cas9.....	92
4.1.1. Επιδράσεις της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 εκτός της περιοχής-στόχου (“off-target” effects) .....	92
4.1.1.1 Τρόποι αντιμετώπισης των επιδράσεων εκτός των περιοχών-στόχων.....	93
4.1.2. Επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων .....	93
4.1.3. Φυσική κατάσταση των μετασηματισμένων κυττάρων .....	95
4.1.4. Παράδοση των στοιχείων του συστήματος.....	95
4.2 Ηθικοί προβληματισμοί.....	97
4.3. Μελλοντικές προοπτικές .....	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	102
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	105
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	112



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

# **1.1. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ: ΑΠΟ ΤΟΝ ΟΜΟΛΟΓΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΣΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ**

## **1.1.1. Ιστορική αναδρομή**

### **1.1.1.1 Η διαδικασία της στόχευσης γονιδίων μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού**

Από τότε που το DNA ταυτοποιήθηκε ως η μονάδα κληρονομικότητας και ως η βάση για το κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας, σύμφωνα με το οποίο το DNA μεταγράφεται σε RNA και το RNA μεταφράζεται σε πρωτεΐνες, οι επιστήμονες επιδίωξαν με πειραματικές μεθόδους να καταλάβουν με ποιον τρόπο το DNA ελέγχει την κληρονομικότητα. Η ανακάλυψη εργαλείων Μοριακής Βιολογίας, όπως είναι τα περιοριστικά ένζυμα, η αλληλούχιση και η αντιγραφή του DNA, έκανε τους επιστήμονες να στραφούν σύντομα σε πειραματικές παρεμβάσεις με σκοπό να αλλάξουν το χρωμοσωμικό DNA σε κύτταρα και ζώα (Lanigan et al., 2020). Το 1972, ο Paul Berg κατασκεύασε το πρώτο ανασυνδυασμένο μόριο (Portin et al., 2014; Ramezankhani et al., 2021). Την ίδια χρονιά οι Herbert Boyer και Stanley Norman Cohen μετέφεραν απευθείας ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA από έναν οργανισμό σε έναν άλλο (Hughes et al., 2001; Ramezankhani et al., 2021), και ένα χρόνο αργότερα, το 1973, δημοσίευσαν ένα άρθρο πάνω στην κατασκευή πλασμιδίων. Υπογράμμισαν την αρχή μιας νέας εποχής στον τομέα της ενσωμάτωσης και επεξεργασίας γονιδίων. Δώδεκα περίπου χρόνια μετά, το 1984, αναπτύχθηκε η αποκαλούμενη ως διαδικασία γονιδιακής στόχευσης (gene targeting) με την αξιοποίηση του φαινομένου του ομόλογου ανασυνδυασμού (Smithies et al., 1984; Smithies et al., 1985; Ramezankhani et al., 2021).

Πιο συγκεκριμένα, καινοτόμες μελέτες από τον αποβιώσαντα Oliver Smithies αποκάλυψαν πως ομόλογα μόρια DNA μπορούσαν να ανασυνδυαστούν και να εισαχθούν ορθά σε καθορισμένες χρωμοσωμικές θέσεις θηλαστικών (Smithies et al., 1984, 1985; Fernández et al., 2017). Τα ευρήματα αυτά ήταν καίριας σημασίας για τον οραματισμό και την ανάπτυξη μεθοδολογιών στόχευσης γονιδίων σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells, ESCs) ποντικών από τους Oliver Smithies, Mario Capecchi και Martin Evans, οι οποίοι και βραβεύτηκαν από κοινού με το Nobel Φυσιολογίας ή Ιατρικής το 2007 (Mak et al., 2007; Fernández et al., 2017). Στα πρώτα αυτά πειράματα, η καταγεγραμμένη αποτελεσματικότητα της στοχευμένης ενσωμάτωσης

μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Homologous Recombination, HR) σε καλλιεργούμενες σειρές σωματικών κυττάρων, ήταν σχετικά χαμηλή (στη βέλτιστη περίπτωση 1:1000), ακόμη και παρουσία κάποιου δείκτη επιλογής (Smithies et al., 1985; Fernandez et al., 2017). Η χαμηλή αποτελεσματικότητα, άρα και η απουσία εμβρυονικών κυτταρικών σειρών από άλλα θηλαστικά εκτός από ποντίκια, ευθύνεται για το ότι η μέθοδος αυτή δε βρήκε εφαρμογή σε άλλα είδη. Παρόλα αυτά, παραμένει μέχρι και σήμερα μια κλασική μέθοδος για την παραγωγή επεξεργασμένων κυττάρων ή ποντικών knock out<sup>1</sup> (Silva G. et al., 2011). Η στόχευση άρα ενός γονιδίου είναι μια τεχνική με γερές βάσεις, η οποία εφαρμόζεται σε πρότυπους οργανισμούς. Σκοπός της είναι να τροποποιήσει τη γονιδιωματική αλληλουχία αξιοποιώντας το σύστημα ομόλογου ανασυνδυασμού του ξενιστή (Lisa Li et al., 2014).

### **1.1.1.2 Οι θραύσεις της διπλής έλικας ως καινοτόμο εργαλείο**

Προκειμένου να δοθεί λύση στον περιορισμό της προαναφερόμενης στόχευσης γονιδίων μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού, αναπτύχθηκαν νεότερες τεχνολογίες, οι οποίες κατέστησαν την άμεση γονιδιωματική επεξεργασία δυνατή σε όλα τα είδη κυττάρων και οργανισμών (Carroll, 2014; Gaj et al., 2013; Randhawa & Sengar, 2021). Οι ανερχόμενες αυτές μέθοδοι βασίζονται στην πρόκληση δίκλωνων θραύσεων (Double-Strand Breaks, DSBs), οι οποίες στη συνέχεια επιδιορθώνονται από τους ενδογενείς μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA του κυττάρου. Η έρευνα σχετικά με τη βλάβη και την επιδιόρθωση του DNA οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι δίκλωνες θραύσεις μπορούν να ενισχύσουν τη δυνατότητα γονιδιακής επεξεργασίας και την τοπική μεταλλαξιγένεση (Randhawa & Sengar, 2021; Youds & Boulton, 2011). Συγκεκριμένα, με μια σειρά πειραμάτων δείχθηκε πως η ιονίζουσα ακτινοβολία προκαλεί δίκλωνες θραύσεις που οδηγούν σε επιχιασμούς μεταξύ ομόλογων χρωματίδων (Latt et al., 1981). Επιπλέον, βρέθηκε ότι οι δίκλωνες θραύσεις προωθούν τον ανασυνδυασμό μεταξύ ομόλογων αλληλουχιών κατά τη διάρκεια της μείωσης (Randhawa & Sengar et al., 2021; Youds & Boulton et al., 2011). Τέλος, η ενεργοποίηση των ομόλογων μονοπατιών επιδιόρθωσης

---

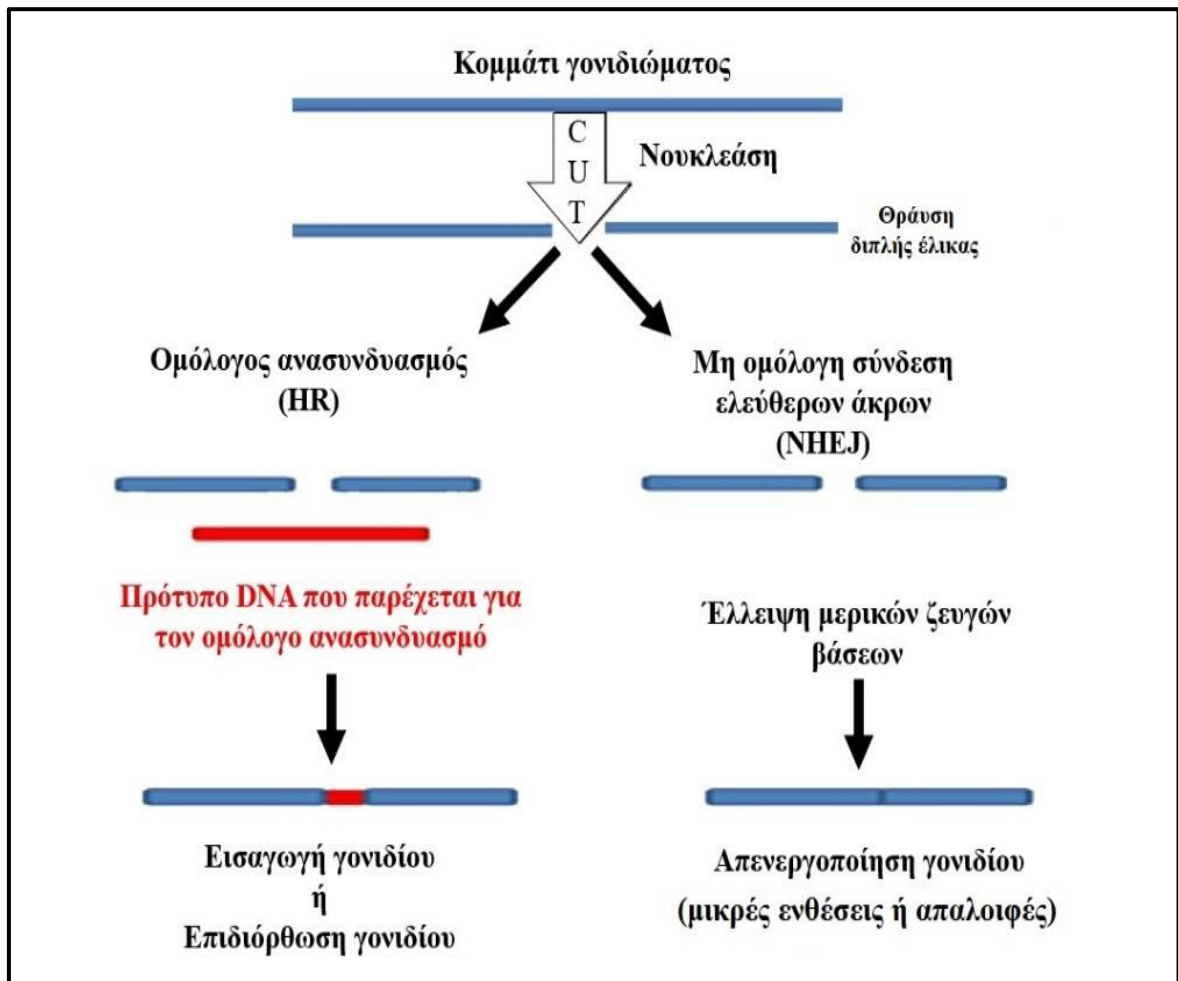
<sup>1</sup> Πρόκειται για γενετικά τροποποιημένα ποντίκια στα οποία έχει απενεργοποιηθεί ένα υπάρχον γονίδιο αντικαθιστώντας το ή διακόπτοντάς το με ένα τεχνητό κομμάτι DNA.

προκύπτει ως απάντηση στις δίκλωνες θραύσεις που προκαλούνται από προγραμματιζόμενες νουκλεάσες (CRudin et al., 1989;Randhawa & Sengar et al., 2021).

Στις μέρες μας, οι τεχνολογίες γονιδιοματικής επεξεργασίας περιλαμβάνουν τις εξής προγραμματισμένες νουκλεάσες που προκαλούν DSBs σε συγκεκριμένους γονιδιοματικούς τόπους (Kim & Kim et al., 2014;Song et al., 2014): τις μεγανουκλεάσες (Meganucleases, MNs), τις νουκλεάσες με δακτύλους ψευδαργύρου (Zinc-Finger Nucleases, ZFNs), τις νουκλεάσες-τελεστές που μοιάζουν με ενεργοποιητές μεταγραφής (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALENs) και τις ομαδοποιημένες κανονικά κατανεμημένες βραχείες παλίνδρομες επαναλήψεις (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη Cas που σχετίζεται με το σύστημα CRISPR (CRISPR-associated protein) (Randhawa & Sengar et al., 2021).

#### **1.1.1.2.1 Δίκλωνες θραύσεις και ενδογενείς μηχανισμοί επιδιόρθωσης του κυττάρου**

Οι ενδογενείς μηχανισμοί επιδιόρθωσης του κυττάρου ενεργοποιούνται μετά τις δίκλωνες θραύσεις, με σκοπό να σφραγίσουν το κενό που δημιουργήθηκε στο γονιδίωμα (Fernández et al., 2017). Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι μηχανισμών επιδιόρθωσης: η εξαρτώμενη από την ομολογία επιδιόρθωση (Homology-Directed Repair, HDR) με την παρουσία επαρκών μορίων DNA-δότη και η σύνδεση μη ομόλογων ελεύθερων άκρων (Non-Homologous End Joining, NHEJ), η οποία λαμβάνει χώρα απουσία πρότυπου DNA-δότη (Randhawa & Sengar, 2021). Ανάλογα με το μονοπάτι επιδιόρθωσης που θα ακολουθήσει το κύτταρο, προκύπτουν είτε γεγονότα διάρρηξης γονιδίων (gene disruption), τα οποία σχετίζονται με μικρές ενθέσεις ή απαλοιφές νουκλεοτιδίων (Insertions and Deletions, INDELS), μέσω του μονοπατιού NHEJ, είτε γεγονότα επεξεργασίας γονιδίων μέσω του μονοπατιού HDR (Fernández et al., 2017) (**Εικόνα 1**).



**Εικόνα 1. Τα αποτελέσματα της γονιδιωματικής επεξεργασίας.** Οι νουκλεάσες προκαλούν δίκλωνη θραύση, η οποία επιδιορθώνεται μέσω δύο μονοπατιών: είτε με το εξαρτώμενο από την ομολογία μονοπάτι (HDR), όπου χρησιμοποιείται αλληλουχία-δότη, είτε με το μονοπάτι της ομόλογης σύνδεσης ελεύθερων άκρων (NHEJ), όπου απουσιάζει η αλληλουχία-δότη. Το μονοπάτι NHEJ προκαλεί μερικές ενθέσεις ή απαλοιφές βάσεων, δημιουργώντας ένα indel, ή μετατόπιση πλαισίου που προκαλεί διάρρηξη του γονιδίου. Στο μονοπάτι HDR, το DNA του δότη (που μπορεί να είναι πλασμίδιο ή μονόκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο), μπορεί να ενσωματωθεί στο σημείο ενδιαφέροντος για να τροποποιήσει το γονίδιο με την εισαγωγή νουκλεοτιδίων, η οποία με τη σειρά της προκαλεί την εισαγωγή συμπληρωματικού DNA ή την επαγωγή μετατόπισης πλαισίου [Προσαρμογή από (Khalil et al., 2020; Walker-Daniels et al., 2013)].

### 1.1.1.3 Οι νουκλεάσες ως εργαλεία γονιδιωματικής επεξεργασίας

#### 1.1.1.3.1 Μεγανουκλεάσες (Meganucleases, MNs)

Οι μεγανουκλεάσες, οι οποίες ανακαλύφθηκαν το 1985, είναι φυσικές ενδο-δεοξυριβονουκλεάσες που απαντώνται σε κάθε μορφή μικροβιακής ζωής, όπως επίσης και στα ευκαρυωτικά μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες (Khalil et al., 2020). Το 1994 και 1995, δέκα χρόνια μετά την ανακάλυψη της μεγανουκλεάσης ζυμομύκητα I-SceI,



αποδείχθηκε πως εκείνη μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να προάγει τον ομόλογο ανασυνδυασμό στα χρωμοσώματα θηλαστικών, με συχνότητα 100 φορές μεγαλύτερη από ότι ο αυθόρμητος ανασυνδυασμός (Fernández et al., 2017). Η I-SceI αποτελεί μια ενδονουκλεάση με χαμηλή συχνότητα πέψης (rare-cutter), με μία θέση αναγνώρισης 18 ζευγών βάσεων, η οποία «φιλοξενεί» ιντρόνια στα μιτοχόνδρια ζυμομυκήτων (Jacquer and Dujon et al., 1985; Fernández et al., 2017). Μελέτες πάνω στο σύστημά της έθεσαν τις βάσεις για τις εφαρμογές της γονιδιακής επεξεργασίας, όπως είναι η επιδιόρθωση, η ένθεση και η απαλοιφή ενός γονιδίου (Ramezankhani et al., 2021; Silva et al., 2011). Εκτός από την I-SceI, και η μεγανουκλεάση I-CreI χρησιμοποιείται ευρέως στη γονιδιοματική επεξεργασία.

Τόσο η I-SceI όσο και η I-CreI είναι μεγανουκλεάσες που απαντώνται στα μιτοχόνδρια και ανήκουν στην οικογένεια LAGLIDADG των εσωτερικών ή αλλιώς «homing» ενδονουκλεασών, οι οποίες αναγνωρίζουν θέσεις που αντιστοιχούν σε γονίδια ελεύθερα από ιντρόνια και ιντεΐνες<sup>2</sup> (Khalil et al., 2020). Οι ενδονουκλεάσες αυτές έχουν υψηλή εξειδίκευση, η οποία οφείλεται στην ικανότητά τους να κόβουν το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις αναγνώρισης, που αποτελούνται από 14-40 ζεύγη βάσεων (Zheng et al., 2020). Οι μεγάλες σε μήκος θέσεις αναγνώρισης και η χαμηλή κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα θηλαστικών τις καθιστούν ελκυστικό εργαλείο γονιδιοματικής επεξεργασίας (Zhang and Zhang et al., 2019). Σε αντίθεση με τα περιοριστικά ένζυμα, τα οποία παρέχουν άμυνα στα βακτήρια ενάντια σε εισβάλλοντα DNA, οι μεγανουκλεάσες διευκολύνουν την έμμεση κινητικότητα των γενετικών στοιχείων μέσα σε έναν οργανισμό. Οι φυσικές μεγανουκλεάσες λοιπόν δρουν σαν κινητά γενετικά στοιχεία και επάγουν διακοπές της διπλής έλικας προκειμένου να εισάγουν ιντρόνια στις επιθυμητές θέσεις (Metzger et al., 2011; Zheng et al., 2020). Δεδομένης όμως της ανεπάρκειας των φυσικών μεγανουκλεασών που διατίθενται για να αναγνωρίσουν διάφορες επιθυμητές περιοχές στην κλινική πράξη, κρίνεται αναγκαία η κατασκευή τεχνητών μεγανουκλεασών. Η διαδικασία αυτή είναι χρονοβόρα και χαρακτηρίζεται από υψηλό κόστος υλοποίησης, γεγονός που ενδεχομένως να περιορίζει την εκτεταμένη χρήση μεγανουκλεασών στη γονιδιοματική επεξεργασία (Zheng et al., 2020).

---

<sup>2</sup> Πρόκειται για ιντρόνια πρωτεϊνών τα οποία αποκόπτονται αυτοκαταλυτικά από τα πολυπεπίδια ξενιστές για να παράγουν μία λειτουργική πρωτεΐνη. Είναι επίσης μεταθετά γενετικά στοιχεία, τα οποία εισβάλλουν στα γονίδια του ξενιστή σε επίπεδο DNA και στη συνέχεια εκφράζονται σαν παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες εντός των πρωτεϊνών.

### 1.1.1.3.2 Νουκλεάσες με δάκτυλο ψευδαργύρου (Zinc finger nucleases, ZFNs)

Οι μεγανουκλεάσες ζυμομυκήτων ήταν οι πρώτες που αξιοποιήθηκαν για την επεξεργασία του γονιδιώματος θηλαστικών (Fernández et al., 2017; Pinto et al., 1998). Σε μία καινοτόμα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν νουκλεάσες με δάκτυλο ψευδαργύρου για να παράγουν τους πρώτους knock-out αρουραίους στον κόσμο. Η θεμελιώδης αυτή αλλαγή στη μεθοδολογία το 2009 έθεσε τις βάσεις για τη μετατροπή του τρόπου παραγωγής διαγονιδιακών ζώων (Fernández et al., 2017; Geurts et al., 2010). Ουσιαστικά η μέθοδος στηρίχθηκε στη σύντηξη της περιοχής της ενδονουκλεάσης του βακτηριακού περιοριστικού ενζύμου *FokI* με τις περιοχές δέσμευσης του DNA των δακτύλων ψευδαργύρου. Το αποτέλεσμα της ένωσης αυτής ήταν η παραγωγή πρωτεΐνης που έχει τη δυνατότητα να προσδένεται στο DNA σε συγκεκριμένη θέση και στη συνέχεια να το κόβει.

Οι νουκλεάσες με δάκτυλο ψευδαργύρου επινοήθηκαν στην πραγματικότητα μερικά χρόνια νωρίτερα, όταν αποδείχθηκε πως οι πρώτες χιμαιρικές πρωτεΐνες (αποτέλεσμα σύντηξης της περιοχής της ενδονουκλεάσης του *FokI* με τις σχεδιασμένες περιοχές πρόσδεσης DNA των δακτύλων ψευδαργύρου) έκοβαν αποτελεσματικά και προήγαγαν γεγονότα ομόλογου ανασυνδυασμού επί συγκεκριμένων γονιδιωματικών αλληλουχιών σε έμβρυα *Xenopus* (Bibikova et al., 2001; Randhawa & Sengar et al., 2021). Με το πέρασμα των χρόνων επήλθε και η βελτίωση της αρχικής μεθοδολογίας, και έτσι οι νουκλεάσες με δάκτυλο ψευδαργύρου χρησιμοποιήθηκαν στην επιδιόρθωση μετάλλαξης που οδηγεί σε σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (Severe Combined Immunodeficiency, SCID), αξιοποιώντας τον ομόλογο ανασυνδυασμό με μία εξω-χρωμοσωμική αλληλουχία δότη (Randhawa & Sengar et al., 2021; Urnov et al., 2005). Η αποτελεσματικότητα της νέας αυτής μεθόδου ήταν ενισχυμένη περίπου κατά 18%. Μία σημαντική παρατήρηση ήταν πως για να συμβεί αποτελεσματική διακοπή της διπλής έλικας του DNA, απαιτούνταν ο διμερισμός της περιοχής ενδονουκλεάσης *FokI*, δηλαδή ήταν απαραίτητη η συνδυαστική δράση δύο ZFNs (Adam Moser, Kevin Range, 2008a; Fernández et al., 2017) (**Εικόνα 2**).

Σύντομα οι νουκλεάσες με δάκτυλο ψευδαργύρου (ZFNs) μετατράπηκαν σε ένα αποτελεσματικό εργαλείο γονιδιακής επεξεργασίας, με εφαρμογές στη γενετική τροποποίηση θηλαστικών. Ξεκινώντας με την αξιοποίησή τους στην παραγωγή διαγονιδιακών αρουραίων (Fernández et al., 2017; Geurts et al., 2010), στη συνέχεια

έφεραν εις πέρας με επιτυχία πειράματα γονιδιοματικής επεξεργασίας σε ποντίκια, βοοειδή και γουρούνια (Fernández et al., 2017). Εκτός από τις *in vivo*<sup>3</sup> μελέτες, έχουν επίσης ευρεία εφαρμογή και σε *in vitro*<sup>4</sup> μελέτες στις οποίες ιόμορφα σωματίδια αδενοσχετιζόμενων ιών (Adeno-Associated Virus particles, AAV particles) λειτουργούν ως φορείς που παραδίδουν τα γενετικά στοιχεία μέσα στο κύτταρο. Παρά το ενδιαφέρον που προκάλεσε η τεχνολογία των ZFNs στο πεδίο της Γενετικής, αποκαλύφθηκαν και ορισμένες ανεπιθύμητες συνέπειες από τη δράση τους (Radecke et al., 2010; Randhawa & Sengar, 2021). Πιο συγκεκριμένα, η εξειδίκευση πρόσδεσης των νουκλεασών στις αλληλουχίες-στόχους δεν είναι υψηλή, συνεπώς η πρωτεΐνη ZFN μπορεί να προσδεθεί και σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος που παρουσιάζουν ομοιότητα με την περιοχή-στόχο. Παρακάμπτοντας το μειονέκτημα αυτό, ορισμένες προκλινικές μελέτες που χρησιμοποίησαν τις ZFNs σε ανθρώπινα κύτταρα, προχώρησαν στο στάδιο των κλινικών δοκιμών. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτέλεσε η κλινική δοκιμή για θραύση του γονιδίου που κωδικοποιεί τον συν-υποδοχέα του HIV, CCR5, η οποία και εγκρίθηκε από τις ρυθμιστικές αρχές των Ηνωμένων Πολιτειών (Randhawa & Sengar et al., 2021).

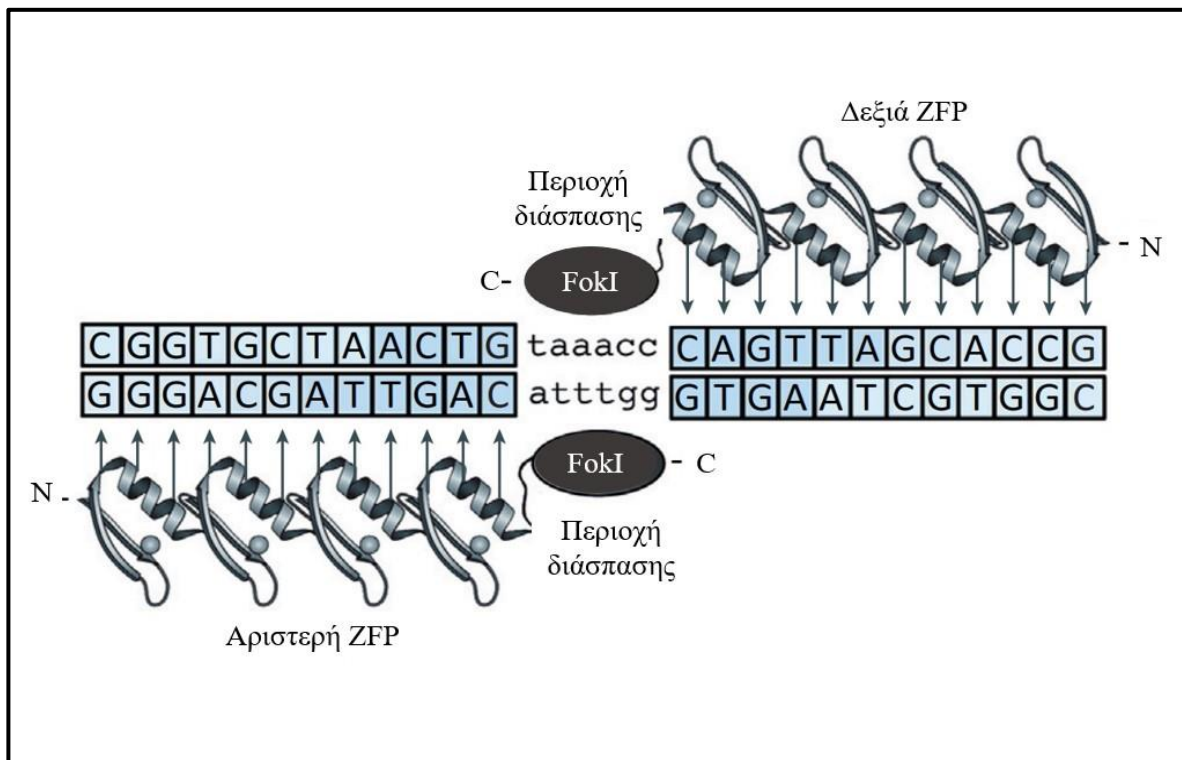
Συμπερασματικά, αν και παρουσιάζει πολλές προοπτικές, η μεθοδολογία ZFN δεν έχει βρει οικουμενική στήριξη από τον ερευνητικό κόσμο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η διαδικασία παραγωγής συνδυασμών δακτύλων ψευδαργύρου, που στοχεύουν σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στο γονιδίωμα, είναι περίπλοκη και κοπιαστική. Ειδικότερα, είναι απαραίτητοι συνδυασμοί περιοχών δακτύλων ψευδαργύρου ώστε να στοχευθούν συγκεκριμένες αλληλουχίες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο κάθε δάκτυλος ψευδαργύρου προσδέεται σε μια αλληλουχία μήκους 3 ζευγών βάσεων. Η κατασκευή των συνδυασμών αυτών, όπως και η κατασκευή της πρωτεΐνης που πρέπει να συντηχθεί με τη νουκλεάση, καθιστούν τη διαδικασία εξαιρετικά σύνθετη και απαιτητική από άποψη εξειδίκευσης, για την επιτυχή έκβασή της. Επιπλέον, είναι χρονοβόρα και με υψηλό κόστος, συνεπώς αποτελεί τεχνολογία που δεν είναι προσιτή για τα περισσότερα εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν προσβάσιμες πλατφόρμες για το σχεδιασμό περιοχών ZFN και οι χημεικές πρωτεΐνες είναι εμπορικά διαθέσιμες, η αποτελεσματικότητα της τεχνολογίας συνεχίζει να ποικίλλει πολύ ανάμεσα

---

<sup>3</sup> Τεχνική πραγματοποίησης πειραμάτων σε ιστούς εντός ζώντος οργανισμού.

<sup>4</sup> Τεχνική πραγματοποίησης ενός δεδομένου πειράματος σε δοκιμαστικό σωλήνα, ή γενικότερα αφορά πειράματα που πραγματοποιούνται υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες έξω από τους ζωντανούς οργανισμούς.

στους διάφορους κυτταρικούς τύπους (Randhawa & Sengar et al., 2021; Swarthout et al., 2011).



**Εικόνα 2** Απεικόνιση ενός διμερούς νουκλεάσης δακτύλου ψευδαργύρου προσδεμένου σε DNA. Οι περιοχές-στόχοι της ZFN αποτελούνται από δύο περιοχές πρόσδεσης των δακτύλων ψευδαργύρου, οι οποίες διαχωρίζονται από μια αλληλουχία μήκους 5-7 ζευγών βάσεων. Η αλληλουχία αναγνωρίζεται από την περιοχή διάσπασης *FokI*. Μπορούν να κατασκευαστούν πρωτεΐνες δακτύλων ψευδαργύρου που θα αναγνωρίζουν μοναδικές αλληλουχίες δεξιά και αριστερά [Προσαρμογή από (Gaj et al., 2013)].

### 1.1.1.3.3 Νουκλεάσες-τελεστές τύπου TALEN (Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)

Το επόμενο κατά σειρά εργαλείο γονιδιωματικής επεξεργασίας είναι οι νουκλεάσες-τελεστές που μοιάζουν με ενεργοποιητές μεταγραφής. Η κατασκευή τους βασίστηκε στα ήδη υπάρχοντα μοτίβα των δακτύλων ψευδαργύρου (Randhawa & Sengar, 2021) και έτσι αποτελούνται από τον τομέα (περιοχή, domain) της νουκλεάσης του *FokI* και από τον τομέα πρόσδεσης στο DNA ο οποίος μπορεί να εξατομικευτεί (M. Song et al., 2014). Οι τελεστές TAL ή TALEs είναι πρωτεΐνες δέσμευσης του DNA σε καθορισμένες περιοχές και προέρχονται από το παθογόνο των φυτών *Xanthomonas sp.*. Το βακτήριο

χρησιμοποιεί τις πρωτεΐνες TALE για να αποδυναμώσει την άμυνα του ξενιστή ενεργοποιώντας γονίδια που ευνοούν τη βακτηριακή λοίμωξη (Pu et al., 2015).

Ο τομέας αναγνώρισης της αλληλουχίας του DNA των νουκλεασών αυτών αποτελείται από μία επαναλαμβανόμενη μονάδα 33-35 συντηρημένων αμινοξέων. Η κάθε επαναλαμβανόμενη μονάδα αναγνωρίζει ένα μόνο ζεύγος βάσεων και είναι σχεδόν πανομοιότυπη, με εξαίρεση δύο εξαιρετικά μεταβλητά αμινοξέα στις θέσεις 12 και 13. Οι δύο θέσεις αυτές αποκαλούνται επαναλαμβανόμενα μεταβλητά δι-κατάλοιπα (Repeat Variable Diresidues, RVDs) (M. Song et al., 2014) και καθορίζουν ουσιαστικά την εξειδίκευση πρόσδεσης στα νουκλεοτίδια στην κάθε επαναλαμβανόμενη μονάδα TALE (C. Wei et al., 2013;Boch and Bonas et al., 2010;Bogdanove and Voytas 2011;Miller et al., 2011). Μάλιστα, άρθρα που δημοσιεύτηκαν το 2009 επιβεβαίωσαν τον καίριο ρόλο των RVDs όσον αφορά τη διαμόρφωση του DNA-στόχου, αναφορικά με το μήκος και τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως το μήκος της περιοχής-στόχου συσχετιζόταν με τον αριθμό των διαδοχικών επαναλαμβανόμενων μονάδων, γεγονός που βοήθησε στην αποκάλυψη της σύνδεσης μεταξύ των υπερμεταβλητών καταλοίπων και της βάσης που προσδέεται στην κάθε επαναλαμβανόμενη μονάδα (Randhawa & Sengar et al., 2021;Boch et al., 2009;Moscou and Bogdanove et al., 2010). Για παράδειγμα η αδενίνη, η κυτοσίνη, η γουανίνη και η θυμίνη αναγνωρίζονται από το NI, HD, NN/NK και NG επαναλαμβανόμενο μεταβλητό δι-κατάλοιπο, αντίστοιχα (C. Wei et al., 2013). Αυτός ο μηχανισμός αναγνώρισης των νουκλεοτιδίων μπόρεσε να λειτουργήσει ως γενετικός κώδικας για τις περιοχές πρόσδεσης στο DNA των TALE και έθεσε ουσιαστικά το αρχιτεκτονικό πλαίσιο για εξατομικευμένες επαναλαμβανόμενες μονάδες σειρών TALE, κατάλληλων για την πρόσδεση στην επιθυμητή αλληλουχία-στόχο (Randhawa & Sengar, 2021).

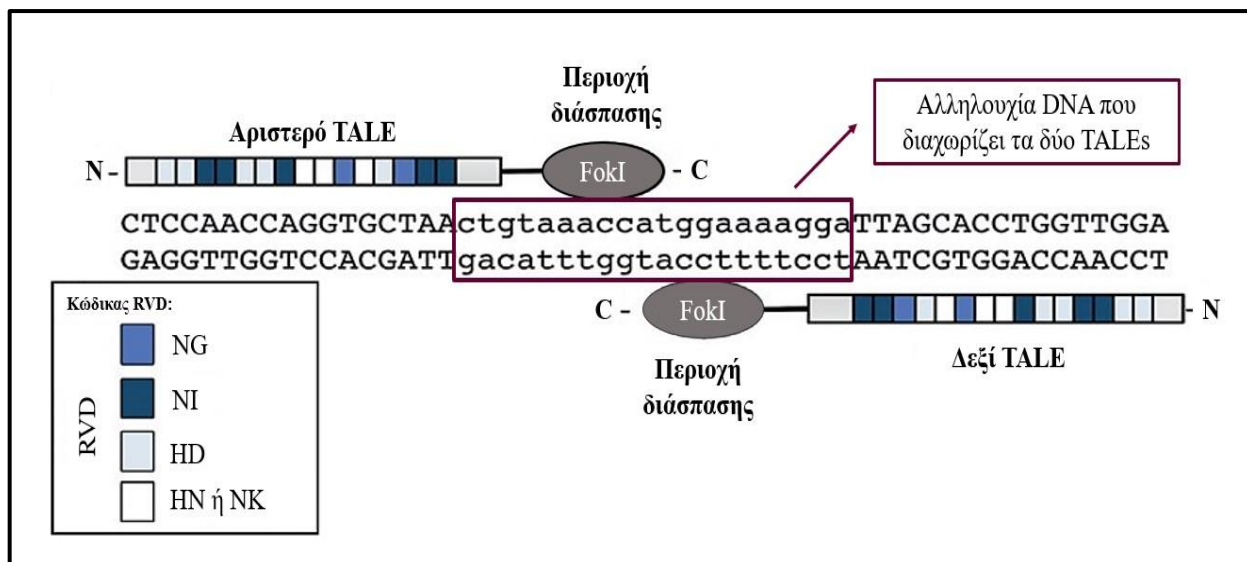
Συνολικά, η δομή μιας TALEN αποτελείται από την αμινοτελική περιοχή, η οποία περιλαμβάνει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS), από την κεντρική περιοχή η οποία κατά κανόνα αποτελείται από διαδοχικές αλληλουχίες TALE που αναγνωρίζουν την εκάστοτε αλληλουχία DNA και από την καρβοξυτελική περιοχή της λειτουργικής ενδονουκλεάσης *FokI* (C. Wei et al., 2013).

Όπως προέκυψε και από τις νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου, ο τομέας *FokI* απαιτεί διμερισμό προκειμένου να λειτουργήσει, και έτσι ένα ζεύγος TALENs πρέπει να σχεδιαστεί προκειμένου να αναγνωριστούν DNA αλληλουχίες δεξιά και αριστερά από την περιοχή-στόχο που έχει οριστεί (Pu et al., 2015). Το κάθε TALEN θα προσδεθεί στην

αντίστοιχη αλληλουχία DNA που αναγνωρίζει, ενώ μεταξύ τους υπάρχει μια διαχωριστική αλληλουχία DNA μήκους συνήθως 14-20 ζευγών βάσεων, η οποία διευκολύνει τον ετεροδιμερισμό του *FokI*. Στη συνέχεια, το διμερές *FokI* κόβει στην περιοχή του διαχωριστικού DNA προκαλώντας διακοπή της διπλής έλικας. Οι διακοπές διπλής έλικας με τη σειρά τους επιδιορθώνονται είτε από το μονοπάτι NHEJ, το οποίο συχνά δημιουργεί μικρές ενθέσεις ή απαλοιφές (INDELS), απαραίτητες για την τροποποίηση του γονιδιώματος στην επιθυμητή περιοχή, είτε από το μονοπάτι HDR (C. Wei et al., 2013) (Εικόνα 3).

Οι νουκλεάσες τύπου TALEN έχουν σημαντική επίδραση σε μια πληθώρα τομέων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, επιτρέποντας την αποτελεσματική αλλαγή αλληλουχιών σε πρότυπους οργανισμούς που προηγουμένως δεν μπορούσαν να τροποποιηθούν. Οι οργανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν από απλούστερα ταξινομικά φύλα μικροφυκών έως ανώτερα θηλαστικά, όπως το γένος φυκών *Nannochloropsis*, τη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster*, τους νηματώδεις σκώληκες, τα ψάρια ζέβρα, τους αρουραίους. Επιπλέον έχουν φανεί χρήσιμες στην τροποποίηση ενδογενών γονιδίων στους μεταξοσκώληκες και τους γρύλους (Randhawa & Sengar et al., 2021).

Η ανακάλυψή τους επομένως έφερε την επανάσταση στον τομέα της Γενετικής Μηχανικής. Εκτός από την ευκολότερη προσαρμογή τους συγκριτικά με άλλες τεχνολογίες, διεύρυναν την ικανότητα και την ποικιλία των εργαλείων γονιδιωματικής επεξεργασίας. Οι πρωτεΐνες-τελεστές TAL μπορούν να προσδεθούν και σε ενεργοποιητές και υποδοχείς γονιδίων πέρα από τη νουκλεάση (Mahfouz et al., 2012; Randhawa & Sengar et al., 2021; Zhang et al., 2011). Τα χαρακτηριστικά αυτά έκαναν τις TALENs να ξεχωρίσουν και να υπερισχύσουν έναντι των ZFNs και των μεγανουκλεασών. Η δράση σε περιοχές εκτός στόχου που φέρουν παρόμοια αλληλουχία με την περιοχή-στόχο (off-target effect) αποτελεί βασικό μειονέκτημα, το οποίο όμως παραμένει κοινό για όλες τις προγραμματιζόμενες νουκλεάσες (Kanchiswamy et al., 2016; Mussolino et al., 2011). Μέχρι σήμερα οι TALENs έχουν αξιοποιηθεί για τη στόχευση γονιδιωματικών περιοχών σε διάφορες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, όπως τα ανθρώπινα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (Human Embryonic Stem Cells, hESCs) και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs) (Adam Moser, Kevin Range, 2008b; Ding et al., 2014; Holkers et al., 2013; Pu et al., 2015).



**Εικόνα 3 Στόχευση γονιδίου μέσω του συστήματος TALEN.** Οι πρωτεΐνες TALE, αριστερά και δεξιά από την περιοχή του DNA-στόχου προσδένονται στις αντίστοιχες αλληλουχίες DNA, που αναγνωρίζουν και προκαλούν διακοπή της διπλής έλικας αφού γίνει διμερισμός των συντηγμένων FokI ενδονουκλεασών (απεικονίζονται με γκρι χρώμα στο σχήμα). Μεταξύ των περιοχών πρόσδεσης των TALEs παρεμβάλλεται μία αλληλουχία DNA μεταβλητού μήκους (12-20 ζεύγη βάσεων). Μπορούν να σχεδιαστούν TALEs για να αναγνωρίζουν μοναδικές αλληλουχίες πρόσδεσης. Στο σχήμα φαίνονται και τα στοιχεία που απαρτίζουν τις RVDs (Προσαρμογή από (Gaj et al., 2013; Pu et al., 2015)).

#### 1.1.1.3.4 Η ανακάλυψη του CRISPR

Το προϊόν του γονιδίου *iap* (isoenzyme alkaline phosphatase) που παράγεται από το βακτήριο *Escherichia coli* ρυθμίζει τη μετατροπή του ισοενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης. Το 1987, για τον καθορισμό της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το *iap* και της πρωτοταγούς της δομής, έγινε αλληλούχιση του γονιδίου και των εκατέρωθεν πλευρικών του περιοχών, κατά την οποία βρέθηκε μια ασυνήθιστη δομή στην 3' πλευρική του περιοχή. Πιο συγκεκριμένα, περιγράφηκαν πέντε υψηλά ομόλογες αλληλουχίες που επαναλαμβάνονταν, ενώ υπήρχε μεσοδιάστημα μεταξύ της κάθε επανάληψης (Chen et al., 2020; Ishino et al., 1987). Μέχρι εκείνη την εποχή δεν είχαν βρεθεί αλληλουχίες ομόλογες με τις παραπάνω σε άλλα προκαρυωτικά κύτταρα και έτσι η βιολογική τους λειτουργία παρέμενε άγνωστη. Η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε την πρώτη αναφορά των Κανονικά Καταμεμημένων Βραχείων Παλίνδρομων Επανάληψεων (Chen et al., 2020). Παρόμοιες τέτοιες «περίεργες» αλληλουχίες βρέθηκαν στα Αρχαία *Haloferax* και *Haloarcula* (Mojica et al., 1993) και στο *Mycobacterium tuberculosis* (van Soolingen et al. 1993). Αν και ταυτοποιήθηκαν σε 20 μικροβιακά είδη, και συνολικά σε περισσότερο από το 40% των

βακτηρίων και σε περισσότερο από το 90% των Αρχαίων, ο ρόλος τους συνέχιζε να αποτελεί μυστήριο (Lino et al., 2018).

Τα μοτίβα παρουσίαζαν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους στα οποία οφείλεται και η ονομασία CRISPR που τους δόθηκε (Sahel et al., 2019;Al-Attar et al., 2011). Συγκεκριμένα, επρόκειτο για ξεχωριστές μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες, (Sahel et al., 2019;Lintnet et al., 2011), με μεσοδιαστήματα ανάμεσά τους (καθώς περιέχουν μια ξένη αλληλουχία που λειτουργεί ως διαχωριστικό) (Sahel et al., 2019;Al-Attar et al., 2011). Το 2005, οι Mojica, Pourcel και Bolotin, σε ανεξάρτητες μεταξύ τους μελέτες, ανέφεραν πως τα μη επαναλαμβανόμενα μεσοδιαστήματα CRISPR που παρεμβάλλονταν μεταξύ των «περίεργων αλληλουχιών», προέρχονταν από ξένο χρωμοσωμικό DNA, και συγκεκριμένα από DNA βακτηριοφάγων (Lino et al., 2018;Lander et al., 2016). Έτσι το 2005 θεωρήθηκε μια πολύ σημαντική χρονιά για το σύστημα CRISPR/Cas (Javed et al., 2018). Το 2007, προτάθηκε πως όταν το *E. coli* εκτεθεί παρατεταμένα σε έναν ιό, τότε ένα κομμάτι DNA φαίνεται πως εισάγεται στις μη επαναλαμβανόμενες περιοχές CRISPR, προερχόμενο από μία γονιδιοματική αλληλουχία φάγου. Συνεπώς, το σύστημα CRISPR/Cas λειτουργεί στο *E.coli* σαν ένα αμυντικό σύστημα ενάντια στις επιθέσεις από φάγους (Sahel et al., 2019;Barrangou et al., 2007). Το συμπέρασμα αυτό επεκτάθηκε, και έτσι ορίστηκε ότι το σύστημα CRISPR μπορεί να λειτουργήσει σαν ένας προσαρμοστικός αμυντικός μηχανισμός των βακτηρίων και των Αρχαίων ενάντια στους φάγους.





## **ΣΤΟΧΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Με την ανακάλυψη των προγραμματισμένων νουκλεασών, η γονιδιωματική επεξεργασία αναβαθμίστηκε και ανοίχθηκαν δρόμοι για ευρύτερη εφαρμογή της σε πεδία όπως η πράσινη Βιοτεχνολογία με την παραγωγή διαγονιδιακών οργανισμών με επιθυμητά χαρακτηριστικά (ζώων και φυτών). Ειδικά η ανακάλυψη της τεχνολογίας CRISPR αποτέλεσε σταθμό κεντρίζοντας το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας.

Η παρούσα διπλωματική επικεντρώνεται στο σύστημα CRISPR/Cas9 σε μια προσπάθεια κατανόησης του τρόπου με τον οποίο δύναται να ασκήσει γονιδιωματική επεξεργασία στα επιθυμητά κύτταρα. Σημαντική είναι η αποσυναρμολόγησή του, η μελέτη των επιμέρους στοιχείων του και του τρόπου με τον οποίο αυτά μπορούν να μεταφερθούν στον εκάστοτε οργανισμό του ενδιαφέροντός μας, και ειδικότερα στον άνθρωπο.

Το κυριότερο ζήτημα που πραγματεύεται η παρούσα μελέτη είναι οι πιθανοί τρόποι δράσης του συστήματος CRISPR/Cas9 ως θεραπευτικού παράγοντα στον αγώνα για την καταπολέμηση νόσων του ανθρώπου. Αναφέρονται στοιχεία που αποδεικνύουν τη δυνατότητα για θεραπευτική γονιδιωματική έναντι ασθενειών που προκαλούνται από ιούς, όπως ο ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, αλλά και την αντιμετώπιση του καρκίνου, της κυστικής ίνωσης, διαφόρων αιματολογικών διαταραχών, μυϊκών δυστροφιών και άλλων γενετικών νόσων. Παρουσιάζοντας τα διαθέσιμα δεδομένα μαζί με τις προκλήσεις που τα συνοδεύουν αποκτάται μια σφαιρική εικόνα για την προοπτική που παρουσιάζει η τεχνολογία CRISPR στα πλαίσια της θεραπευτικής ανθρωπίνων νόσων στο μέλλον.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 2.1. Συστατικά στοιχεία του συστήματος CRISPR/Cas9

### 2.1.1. Τα γονίδια *Cas* που σχετίζονται με το σύστημα CRISPR (CRISPR-associated *Cas* genes)

Τέσσερα γονίδια που σχετίζονται με το σύστημα CRISPR ταυτοποιήθηκαν σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, τα οποία όπως παρατηρήθηκε πάντα εντοπίζονταν κοντά στην περιοχή CRISPR (Shengmiao Chen et al., 2020; Jansen et al., 2002). Η χωροταξική αυτή συσχέτιση μεταξύ του τόπου CRISPR και των γονιδίων *Cas* υποδηλώνει μια δυναμικά λειτουργική σχέση μεταξύ τους. Σταδιακά, η οικογένεια των γονιδίων *Cas* εξαπλώθηκε σε πολλά βακτηριακά είδη. Κατά τη διαδικασία ανάλυσης της αλληλουχίας CRISPR σε 24 στελέχη των *Streptococcus thermophilus* και *Streptococcus agalactiae*, κάποιες από τις διαχωριστικές αλληλουχίες βρέθηκε να είναι ομόλογες με γνωστά γονίδια, τα οποία είναι συχνά παρόντα σε φάγους, πλασμίδια και άλλα εξω-χρωμοσωμικά στοιχεία (Shengmiao Chen et al., 2020). Ειδικά δε στην περίπτωση του βακτηρίου *S. thermophilus*, το γονίδιο *Cas9*, σε αντίθεση με τα άλλα γνωστά γονίδια *Cas*, ήταν ένα μεγάλο γονίδιο που κωδικοποιούσε μία πρωτεΐνη-τελεστή με δράση νουκλεάσης (Uddin et al., 2020).

Όπως αποκαλύφθηκε, τα βακτήρια μετά από ιική προσβολή, ενσωματώνουν το γονιδίωμα του φάγου και από αυτό προκύπτει μία νέα διαχωριστική αλληλουχία (Chen et al., 2020; Barrangou et al., 2007). Ορισμένα γονίδια *Cas* εμπλέκονται στην εισαγωγή των διαχωριστικών και των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών CRISPR. Με την αφαίρεση ή την επαναπροσθήκη των διαχωριστικών αλληλουχιών, ο ανθεκτικός στους φάγους φαινότυπος των βακτηρίων τροποποιείται ανάλογα. Συνεπώς, το CRISPR και το σχετιζόμενο γονίδιο *cas* αναπτύσσουν από κοινού έναν βακτηριακό μηχανισμό αντίστασης στους φάγους, η εξειδίκευση του οποίου εξαρτάται από την ομοιότητα της διαχωριστικής αλληλουχίας με το γονιδίωμα του φάγου (Chen et al., 2020; Barrangou et al., 2007).

### 2.1.2. Το ένζυμο Cas9

Το ένζυμο Cas9 διαθέτει τεράστιες δυνατότητες για τη Γενετική Μηχανική (Barman et al., 2020; Wilkinson et al., 2019), καθώς πρόκειται για μία DNA ενδονουκλεάση η οποία μπορεί να ανιχνεύσει και να αλλοιώσει οποιαδήποτε ξένα

νουκλειϊκά οξέα, και έτσι χρησιμοποιείται εκτεταμένα στη Βιοτεχνολογία στα πλαίσια της γονιδιοματικής επεξεργασίας (Barman et al., 2020; Mali et al., 2013; Chen et al., 2013).

Δομικά πρόκειται για δίλοβο ένζυμο, αποτελούμενο από το λοβό νουκλεάσης (NUC) και το λοβό αναγνώρισης (REC). Ο λοβός NUC απαρτίζεται από τους δύο τομείς νουκλεάσης RuvC και HNH (Barman et al., 2020; Nishimasu et al., 2016), από ένα καρβοξυτελικό άκρο (Breiding, 2014; Y. Ma, Zhang, et al., 2014) και από έναν τομέα που αλληλεπιδρά με την αλληλουχία PAM (Barman et al., 2020; Nishimasu et al., 2016). Ο τομέας HNH κόβει τον συμπληρωματικό κλώνο ως προς την αλληλουχία του κλώνου του RNA-οδηγού, ενώ ο τομέας RuvC κόβει το μη συμπληρωματικό κλώνο αντίστοιχα (H. Chen et al., 2014; Gasiunas et al., 2012; Jiang & Doudna, 2017; Jinek et al., 2012). Ο λοβός REC απαρτίζεται από μια πλούσια σε αργινίνη ελικοειδή γέφυρα (Bridge Helix, BH), και διαιρείται σε τρεις υποτομείς REC1, REC2 και REC3, ενώ είναι απαραίτητος για την πρόσδεση του RNA-οδηγού και του DNA. Οι δύο λοβοί ενώνονται περαιτέρω μέσω δύο συνδετικών κομματιών, ένα που σχηματίζεται από την πλούσια σε αργινίνη ελικοειδή γέφυρα και το άλλο από έναν αποδιοργανωμένο συνδέτη (κατάλοιπα 712-717). Ο λοβός REC αποτελείται από τρεις τομείς α-έλικας (Hell-I, Hell-II, και Hell-III) και δεν εμφανίζει δομική ομοιότητα με άλλες γνωστές πρωτεΐνες (Jiang & Doudna, 2017) (**Εικόνα 4**).

Έχουν απομονωθεί από διαφορετικά βακτηριακά στελέχη αρκετές εκδοχές της νουκλεάσης Cas9, οι οποίες παρουσιάζουν σημαντικά διαφορετικές ιδιότητες όσον αφορά το μέγεθος, την εξειδίκευση της στοχευόμενης αλληλουχίας (Protospacer Adjacent Motif, PAM)<sup>5</sup> και το σημείο πρόκλησης της δίκλωνης θραύσης (Fonslow et al., 2014; Richards et al., 2018).

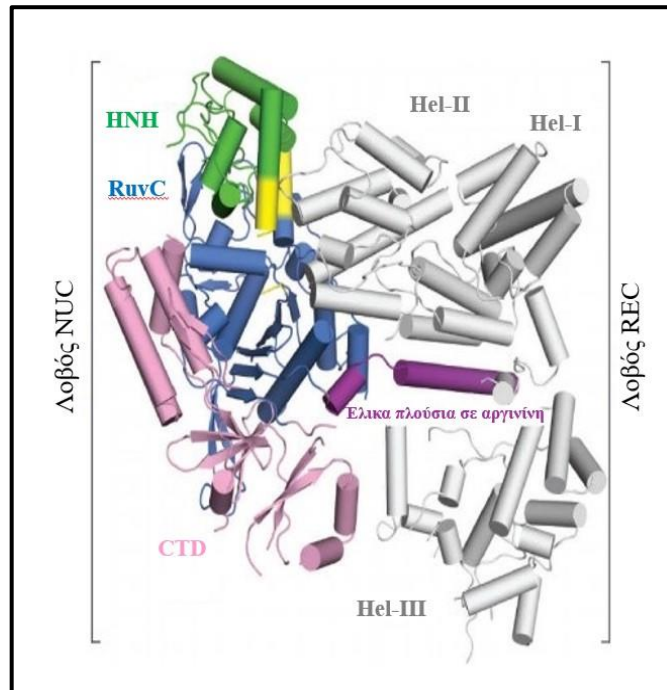
Η πρώτη Cas9 που χρησιμοποιήθηκε εκτός προκαρυωτικών κυττάρων και προγραμματίστηκε προκειμένου να ασκήσει γονιδιοματική επεξεργασία σε κύτταρα θηλαστικών ήταν αυτή του *Streptococcus pyogenes*. Πρόκειται για την Cas9 που χρησιμοποιείται πιο συχνά στις μέρες μας (Pickar-oliver et al., 2020). Είναι γνωστή και με το όνομα SpyCas9, και πρόκειται για μια μεγάλη σε μέγεθος ενδονουκλεάση, με πολλαπλούς τομείς και πολλαπλές λειτουργίες. Ειδικότερα, η θέση πέψης του δίκλωνου DNA βρίσκεται ανοδικά κατά τρία ζεύγη βάσεων σε σχέση με την αλληλουχία PAM, ενώ η πέψη πραγματοποιείται μέσω των

δύο διακριτών τομέων νουκλεάσης που διαθέτει η Cas9 (Jiang & Doudna, 2017). Στη φύση, η πλειοψηφία των παραλλαγών της Cas απαιτεί δύο ξεχωριστά μόρια RNA

---

<sup>5</sup> Αποτελεί το σημείο πρόσδεσης της πρωτεΐνης Cas9 στο DNA

προκειμένου να εκδηλωθεί η στοχευμένη δράση νουκλεάσης. Τόσο το crRNA όσο και το trans-activating RNA (βλ. § 2.3) είναι απαραίτητα (Richards et al., 2018). Αφού σχηματιστεί το υβριδικό μόριο crRNA:tracrRNA, ακολουθεί η συσχέτισή του με την πρωτεΐνη Cas9, και έτσι παράγεται ένα ενεργό ριβονουκλεοπρωτεϊνικό (RNP) σύμπλοκο (Cas9-RNP) (Ebrahimi & Hashemi, 2020; Hashemi et al., 2018; Sternberg et al., 2014; Gasiunas et al., 2012).



**Εικόνα 4 Αναπαράσταση τύπου κορδέλας της κρυσταλλικής δομής της Cas9 του *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9) [Προσαρμογή από (Jiang & Doudna, 2017)].**

### 2.1.3. Λοιπά συστατικά του συστήματος CRISPR

Αμέσως μετά, με την ανακάλυψη του παρακείμενου μοτίβου της πρωτο-διαχωριστικής αλληλουχίας, ή αλλιώς της αλληλουχίας PAM (Protospacer Adjacent Motif), του CRISPR RNA (crRNA) και του trans-activating crRNA (tracr-RNA), πολλά στοιχεία σχετικά με τα συστήματα CRISPR έγιναν ταχέως γνωστά (BrounsRutering et al., 2008; Haurwitz et al., 2010; Javed et al., 2018). Οι αλληλουχίες PAM είναι μικρές σε μήκος (3-5 ζεύγη βάσεων) αλληλουχίες DNA, οι οποίες διαφοροποιούνται μεταξύ των διαφόρων παραλλαγών του συστήματος CRISPR (Waddington et al., 2016; Yosef et al.,



2012). Βρίσκονται δίπλα στην αλληλουχία που στοχεύεται από το crRNA στο εισβάλλον γονιδίωμα, και διαδραματίζουν καίριο ρόλο κατά τα στάδια που περιλαμβάνει ο μηχανισμός δράσης του CRISPR (De La Fuente-Núñez & Lu, 2017; J. Wang et al., 2015). Η αλληλουχία PAM μπορεί να διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό. Για παράδειγμα για την Cas9 του *S. pyogenes* η αλληλουχία PAM είναι 5'-NGG-3'<sup>6</sup>, αν και σε κάποιες περιπτώσεις και η αλληλουχία 5'-NAG-3' είναι αποδεκτή (Gaj et al., 2013; Hsu, 2014; Jiang et al., 2013; Mali et al., 2013). Παραδείγματα αλληλουχιών PAM σε άλλα βακτηριακά είδη περιλαμβάνουν τις: NNNNGATT στη *Neisseria meningitidis*, ή NNAGAA στον *S. thermophilus*.

Ο μηχανισμός δράσης του συστήματος CRISPR παρέμενε παρόλα αυτά άγνωστος και έτσι το ενδιαφέρον μετατοπίστηκε στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο το tracrRNA και το crRNA μαζί με τα γονίδια *Cas* συνεργάζονται για να επιτεθούν στο ξένο DNA που ταιριάζει με το crRNA. Το 2012 η ερευνητής του Πανεπιστημίου Berkley της Καλιφόρνια, Jennifer Doudna, μαζί με τον Emmanuelle Charpentier της Ιατρικής Σχολής του Αννόβερου της Γερμανίας κατάφεραν να αποκωδικοποιήσουν τον τρόπο δράσης του συστήματος. Σημείο σταθμό αποτέλεσε η *in vitro* σύντηξη των Cas9-crRNA από τον *S. thermophilus* και τον *S. pyogenes*. Το αποτέλεσμα ήταν μία RNA-κατευθυνόμενη νουκλεάση με ταιριαστές RNA αλληλουχίες-δολώματα και μια πρωτεΐνη Cas9 η οποία προκαλεί δίκλωνες θραύσεις σε συγκεκριμένο σημείο του DNA. Με την ολοκλήρωση του βήματος αυτού, η διαδικασία του συνδυασμού του crRNA με το tracrRNA ολοκληρώθηκε για το σχηματισμό ενός RNA-οδηγού μονού κλώνου (single guide RNA, sgRNA) (Deltcheva et al., 2011; Javed et al., 2018; Jinek et al., 2012).

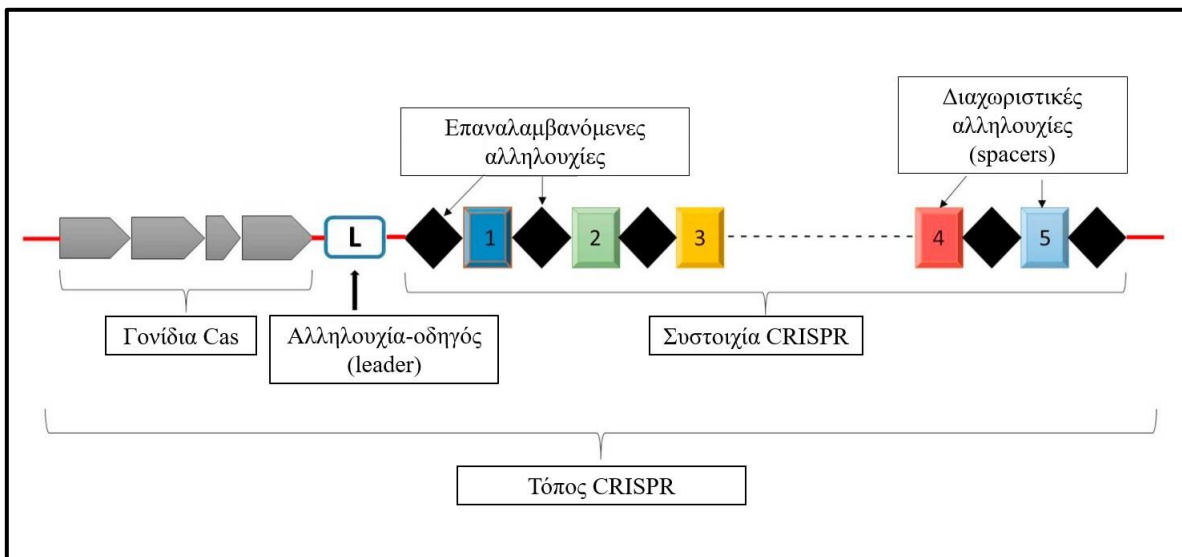
## 2.2. Η σύσταση μιας περιοχής CRISPR

Η συστοιχία CRISPR αποτελείται από μία σειρά υψηλά συντηρημένων μικρών σε μήκος επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται διαχωριστικές αλληλουχίες παρόμοιου μεγέθους, οι λεγόμενοι «spacers» (Brouns Ruterling et al., 2008; Waddington et al., 2016). Οι αλληλουχίες αυτές προέρχονται από ξένο DNA, διακρίνονται για τη μοναδικότητά τους και παρέχουν ειδική ως προς την αλληλουχία ανοσία έναντι ξένων γενετικών στοιχείων. Συνήθως, μία πλούσια σε A-T αλληλουχία

---

<sup>6</sup> Το N συμβολίζει οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο

οδηγός, βρίσκεται ανοδικά της συστοιχίας CRISPR (προς το 5' άκρο) (Barman et al., 2020;Jansen et al., 2002). Η περιοχή οδηγός περιέχει υποκινητές, θέσεις πρόσδεσης για ρυθμιστικές πρωτεΐνες και στοιχεία σημαντικά για την ενσωμάτωση μιας διαχωριστικής αλληλουχίας (Gurta et al., 2019). Στο ένα άκρο της συστοιχίας υπάρχει μια ομάδα συντηρημένων γονιδίων που κωδικοποιούν διάφορα είδη πρωτεϊνών Cas, και ειδικότερα πρόκειται για τα γονίδια *cas* που σχετίζονται με το σύστημα CRISPR (Barman et al., 2020;Marrafni and Sontheimer et al., 2010) (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5 Σχηματική αναπαράσταση ενός τύπου CRISPR.** Οι διαχωριστικές αλληλουχίες (spacers) απεικονίζονται με χρωματιστά πλαίσια, ενώ οι μοναδικές διαχωριστικές αλληλουχίες απεικονίζονται με μοναδικά χρώματα. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες απεικονίζονται με μαύρους ρόμβους. Η ομάδα των γονιδίων *Cas* (γκρι βέλη) βρίσκεται δίπλα στις επαναλαμβανόμενες-διαχωριστικές αλληλουχίες ή στη λεγόμενη συστοιχία CRISPR. Μία αλληλουχία-οδηγός (λευκό πλαίσιο, L) υπάρχει μεταξύ της ομάδας των γονιδίων *Cas* και της συστοιχίας CRISPR [Προσαρμογή από (Gurta et al., 2019)].

Κατά τη διάρκεια μιας μόλυνσης, νέες διαχωριστικές αλληλουχίες μπορούν να προστεθούν στην περιοχή CRISPR. Με τον τρόπο αυτό κατά τη διάρκεια μιας μεταγενέστερης αλληλεπίδρασης με τους ίδιους εισβολείς, οι αλληλουχίες αυτές θα λειτουργήσουν ως «μνήμη» και έτσι θα διευκολύνουν την καταπολέμηση των εισβολέων (Gurta et al., 2019;Barrangou et al., 2007). Σε μια συστοιχία CRISPR, ο αριθμός των μονάδων επαναλαμβανόμενης-διαχωριστικής αλληλουχίας δεν είναι σταθερός και έτσι κυμαίνεται από μερικές έως αρκετές εκατοντάδες, με το μέσο αριθμό να είναι ίσος με 65. Επιπλέον, το μήκος των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών ενδέχεται να διαφέρει μεταξύ διαφορετικών τύπων στο ίδιο γονιδίωμα. Πρόσφατα αποκαλύφθηκε ότι το μήκος των

επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών κυμαίνεται από 18-50 νουκλεοτίδια (nt), ενώ των διαχωριστικών αλληλουχιών από 17-84 νουκλεοτίδια (nt) (Gupta et al., 2019; Marraffini, 2015). Υπάρχει επίσης μία DNA αλληλουχία-στόχος ή gRNA μήκους 20 νουκλεοτιδίων (nt), δίπλα σε μία αλληλουχία μήκους 3 νουκλεοτιδίων προς το 5'-άκρο, η λεγόμενη PAM. Αυτές οι δύο αλληλουχίες αποτελούν δομικά στοιχεία του εισβάλλοντος ξένου γενετικού στοιχείου, δεν είναι όμως μέρος του τόπου CRISPR (Gupta et al., 2019).

### **2.3. Ταξινόμηση του συστήματος CRISPR/Cas**

Η διαρκώς εξελισσόμενη αλληλεπίδραση μεταξύ των προκαρυωτών και των ιών που τους μολύνουν έχει ως αποτέλεσμα την ευρεία παραλλαγή μεταξύ των συστημάτων CRISPR/Cas (Rojo et al., 2018). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότεροι από 13 διαφορετικοί τύποι συστημάτων CRISPR/Cas (Sahel et al., 2019; Rath et al., 2015). Η γενική ταξινόμηση διαχωρίζει τα γνωστά συστήματα CRISPR σε δύο τάξεις (I και II) (Sahel et al., 2019), έξι τύπους και 19 υπότυπους (Rojo et al., 2018). Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται με βάση τη φυλογένεση, την αλληλουχία, την οργάνωση της περιοχής και τα στοιχεία που την απαρτίζουν. Έτσι προκύπτουν οι τρεις μείζονες τύποι I, II και III, με τον τύπο II να είναι αυτός που έχει μελετηθεί περισσότερο. Έχει λάβει ιδιαίτερη προσοχή εξαιτίας της ικανότητάς του να προκαλεί δίκλωνες θραύσεις στο DNA-στόχο. Από το σύνολο των έξι τύπων που έχουν αναγνωριστεί, οι τύποι IV, V και VI ταυτοποιήθηκαν πιο πρόσφατα, και έτσι η μελέτη τους είναι ελλιπής σε σχέση με τους τρεις κύριους τύπους I, II και III (Lino et al., 2018).

Η ομαδοποίηση στις δύο τάξεις γίνεται με βάση τον αριθμό των απαιτούμενων πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται κατά το τελευταίο στάδιο δράσης του CRISPR, δηλαδή αυτό της παρεμβολής. Η τάξη I περιλαμβάνει τους τύπους I,III και IV, ενώ η τάξη II τους τύπους II,V και VI. Το χαρακτηριστικό των τύπων της τάξης I είναι ότι χρησιμοποιούν πολλαπλές πρωτεΐνες, σε αντίθεση με τους τύπους της τάξης II που χρησιμοποιούν μία μόνο πρωτεΐνη (M. Song et al., 2014).

Όσον αφορά τους υπότυπους, για το σύστημα CRISPR τύπου I έχουν ταυτοποιηθεί έξι σε αριθμό (από τον τύπο I-A μέχρι τον τύπο I-F). Το κοινό στοιχείο που καθορίζει τους υπότυπους αυτούς είναι η παρουσία της χαρακτηριστικής πρωτεΐνης Cas3, με τους τομείς ελικάσης και DNAάσης που αυτή διαθέτει για την αποικοδόμηση του στόχου. Τα συστήματα CRISPR τύπου II χωρίζονται σε δύο υπότυπους: II-A και II-B. Κωδικοποιούν

τις πρωτεΐνες Cas1 και Cas2, τη χαρακτηριστική πρωτεΐνη Cas9, και ορισμένες φορές μια τέταρτη πρωτεΐνη (Csn2 ή Cas4). Η Cas9 βοηθά στην προσαρμογή, συμμετέχει στην επεξεργασία του crRNA και κόβει το DNA-στόχο υποβοηθούμενη κατά τη συναρμολόγηση από το crRNA και ένα πρόσθετο RNA, το tracrRNA. Ενώ τα συστήματα CRISPR τύπου I και II είναι γνωστό πως στοχεύουν σε DNA, τα συστήματα τύπου III στοχεύουν σε DNA και/ή σε RNA. Τα τελευταία περιέχουν τη χαρακτηριστική πρωτεΐνη Cas10 (Gupta et al., 2019).

Μια γενική αρχή διέπει και τα τρία συστήματα της μεσολαβούμενης από το CRISPR ανοσίας. Ειδικότερα, ο τύπος CRISPR μεταγράφεται για να παράγει μία RNA-καθοδηγούμενη πρωτεΐνη. Ακολουθεί επεξεργασία του RNA-οδηγού από τις ριβονουκλεάσες Cas έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό (crRNP) σύμπλοκο. Έτσι δημιουργείται ένα μακρύ πρόδρομο μετάγραφο, γνωστό ως pre-crRNA. Σε περίπτωση που μέσα στην αλληλουχία CRISPR υπάρχουν παλίνδρομες αλληλουχίες, τότε το pre-crRNA ενδέχεται να περιέχει δευτερεύουσες δομές που ονομάζονται φουρκέτες. Αυτές οι pre-crRNA αλληλουχίες διασπώνται σε μικρότερα θραύσματα, τα οποία αντιστοιχούν στις επαναλαμβανόμενες και διαχωριστικές περιοχές (Rath et al., 2015; Waddington et al., 2016).

#### **2.4. Πρωτεΐνες Cas**

Οι πρωτεΐνες Cas είναι μια ιδιαίτερα ποικιλόμορφη ομάδα πρωτεϊνών (Gupta et al., 2019). Κωδικοποιούνται από ένα σύνολο γονιδίων που σχετίζονται με το σύστημα CRISPR, τα γονίδια *Cas*, και είναι απαραίτητες για τη δράση του συστήματος. Μελέτες συγκριτικής γονιδιωμικής σε γονιδιώματα βακτηρίων και Αρχαίων προτείνουν την ύπαρξη περισσότερων από 45 οικογενειών γονιδίων *Cas* (Swarts et al., 2012; Waddington et al., 2016). Οι πρωτεΐνες Cas1 και Cas2 είναι οικουμενικές για όλες τις περιοχές CRISPR (και εμπλέκονται στην ενσωμάτωση του spacer), ενώ οι Cas3, Cas9 και Cas10 είναι ειδικές για τους τύπους I, II και III των CRISPR/Cas συστημάτων, αντίστοιχα (Gupta et al., 2019).

## 2.5. Στάδια δράσης κατά το μηχανισμό του συστήματος CRISPR/Cas

Η δραστηριότητα CRISPR απαιτεί έναν τόπο CRISPR που να περιλαμβάνει μια συστοιχία από επαναλαμβανόμενες-διαχωριστικές αλληλουχίες και μια σειρά από γονίδια *Cas*. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες είναι απαραίτητες για δράσεις όπως είναι η επεξεργασία, η λειτουργικότητα και η αποκοπή (Gupta et al., 2019). Ολόκληρος ο μηχανισμός άμυνας μπορεί να συνοψιστεί σε τρία βήματα (Εικόνα 6): (1) ενσωμάτωση, (2) έκφραση και ωρίμανση, και (3) παρεμβολή (Barman et al., 2020; Amitai and Sorek 2016; Puschnik et al. 2017).

### 2.5.1 Ενσωμάτωση των διαχωριστικών αλληλουχιών CRISPR/Cas

Η φάση απόκτησης του τόπου CRISPR δομεί τη γενετική μνήμη του κυττάρου. Σε αυτή τη φάση, οι νέες διαχωριστικές αλληλουχίες οι οποίες αποκτώνται από εισβάλλοντα πλασμίδια ή ξένα DNA ύστερα από την πρώτη επαφή μαζί τους, ενσωματώνονται στη συστοιχία CRISPR. Με τον τρόπο αυτό, το κύτταρο μπορεί και προσαρμόζεται ενάντια στους εισβολείς που βρίσκονται στο περιβάλλον. Για το λόγο αυτό η φάση αυτή καλείται και «προσαρμογή» (Gupta et al., 2019; Barrangou et al., 2007). Η ενσωμάτωση των διαχωριστικών αλληλουχιών συμβαίνει σε δύο βήματα. Σαν πρώτο βήμα, οι πρωτεΐνες Cas του βακτηρίου ταυτοποιούν τον εισβολέα και αποκτούν ειδικές αλληλουχίες από ξένα νουκλεϊκά οξέα. Αυτές αποτελούν τις λεγόμενες πρωτο-διαχωριστικές αλληλουχίες ('protospacer'). Σαν δεύτερο βήμα, η πρωτο-διαχωριστική αλληλουχία ενσωματώνεται στο άκρο της αλληλουχίας-οδηγού στη συστοιχία CRISPR ως διαχωριστική αλληλουχία ('spacer'). Έτσι η πρώτη επαναλαμβανόμενη μονάδα της συστοιχίας CRISPR επεκτείνεται (Barman et al., 2020; Pourcel et al., 2005; Yosef et al., 2012). Οι διαχωριστικές αυτές αλληλουχίες ή αλλιώς 'spacers' ευθύνονται για τη δημιουργία ανοσολογικής μνήμης στα Αρχαία και τα βακτήρια, ώστε να αμυνθούν σε περίπτωση που έρθουν σε επαφή εκ νέου με τα κινητά γενετικά στοιχεία (mobile genetic elements, MGEs) (Barman et al., 2020; Pourcel et al., 2005). Στο τέλος, μπορεί να συμβεί και απαλοιφή ορισμένων spacers ώστε να τεθεί υπό έλεγχο το μέγεθος της συστοιχίας CRISPR, αν και πολύ λίγα στοιχεία είναι γνωστά για τη διαδικασία αυτή (Gupta et al., 2019; Barrangou et al., 2007).

Οι πρωτεΐνες Cas1 και Cas2 είναι οι πιο σημαντικές στη φάση απόκτησης των διαχωριστικών αλληλουχιών του CRISPR. Λειτουργούν ως σύμπλοκο, όπου ένα διμερές

της Cas2 προσδένεται σε δύο διμερή της Cas1 προκειμένου να εκτελέσει τη λειτουργία του. Η παρουσία του PAM είναι προαπαιτούμενη για τη διάκριση μεταξύ του στόχου και της συστοιχίας CRISPR, και αξιοποιείται κατά το πρώτο αυτό στάδιο (Gupta et al., 2019; Barrangou et al., 2007). Όπως έχει αποδειχθεί, νέες διαχωριστικές αλληλουχίες εισάγονται στο άκρο του οδηγού της συστοιχίας CRISPR. Η παλίνδρομη αλληλουχία πολλών επαναλήψεων παρέχει τον απαραίτητο προσανατολισμό και υποδεικνύει τη θέση κατά τη διάρκεια της ενσωμάτωσης του spacer μέσα στη συστοιχία. Ο μηχανισμός του πρώτου αυτού βήματος και η αλληλουχία του μοτίβου PAM ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών συστημάτων CRISPR (Gupta et al., 2019).

### **2.5.2. Έκφραση και ωρίμανση του συστήματος CRISPR/Cas**

Μετά την επιτυχή προσαρμογή των νέων διαχωριστικών αλληλουχιών ακολουθεί η έκφραση των CRISPR RNA (crRNA) και των πρωτεϊνών Cas. Η αλληλουχία-οδηγός λειτουργεί σαν εκκινήτης και ξεκινά τη μεταγραφή της περιοχής. Παράγεται έτσι ένα μακρύ πρόδρομο αντίγραφο RNA (ή αλλιώς pre-crRNA). Ακολουθεί η διαδικασία της επεξεργασίας του σε μικρότερα ώριμα κομμάτια, γνωστά ως crRNA. Η αναπαράσταση του crRNA είναι εμφανής με την ένωση μιας διαχωριστικής περιοχής (αλληλουχία που εμφανίζει συμπληρωματικότητα με ένα ξένο νουκλεϊκό οξύ) στο 5' άκρο με μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία στο 3' άκρο (Barman et al., 2020; Garneau et al., 2010; Barrangou et al., 2015). Ειδικά ο τύπος II, επιστρατεύει την πρωτεΐνη Cas9 για την επεξεργασία του pre-crRNA. Το νεοσυντιθέμενο ώριμο crRNA αλληλεπιδρά με το μικρό tracrRNA και μαζί καθοδηγούν τη θραύση του DNA-στόχου, όπως αυτή επάγεται από την Cas9.

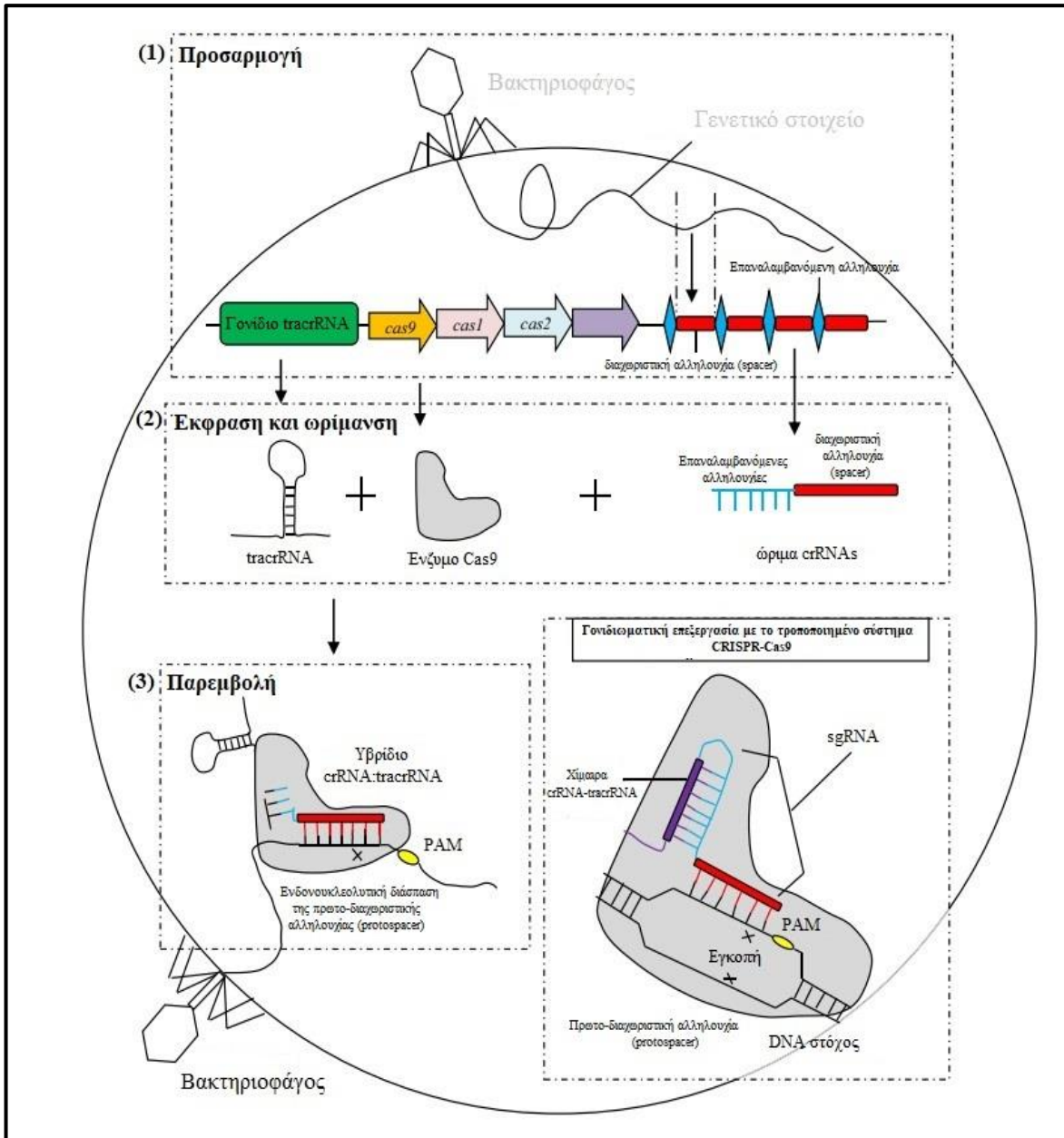
### **2.5.3. Παρεμβολή του συστήματος CRISPR/Cas**

Στο στάδιο αυτό δημιουργείται το σύμπλοκο Cas-crRNA μετά από την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Cas με το crRNA. Το σύμπλοκο αυτό ανιχνεύει τα ξένα κινητά γενετικά στοιχεία μέσω συμπληρωματικότητας των αλληλουχιών ως προς το crRNA, ενώ το στοιχείο που στοχεύεται στη συνέχεια αποκόπτεται (Barman et al., 2020; Amitai and Sorek et al., 2016). Η παρουσία μιας μικρού μήκους (2-5 ζεύγη βάσεων)

συντηρημένης αλληλουχίας (γνωστής ως PAM) είναι απαραίτητη για την ταυτοποίηση εαυτών και μη εαυτών νουκλεϊκών οξέων από το σύμπλοκο Cas-crRNA. Η PAM βρίσκεται δίπλα στην περιοχή-στόχο στο εισβάλλον νουκλεϊκό οξύ (Barman et al., 2020).

## 2.6. Γονιδιωματική επεξεργασία με το σύστημα CRISPR/Cas9 τύπου II

Το σύστημα CRISPR/Cas9 είναι ένα απλό σύστημα δύο στοιχείων που χρησιμοποιείται για την αποτελεσματική στοχευμένη γονιδιωματική επεξεργασία (Εικόνα 6). Το πρώτο στοιχείο είναι η πρωτεΐνη Cas9, η οποία φέρει τους τομείς ενδονουκλεάσης RuvC και HNH. Το δεύτερο στοιχείο είναι το RNA-οδηγός μονού κλώνου (sgRNA), το οποίο φέρει μια αλληλουχία-ικρίωμα (Uddin et al., 2020). Το sgRNA κατευθύνει την ενδονουκλεάση Cas9 και αναγνωρίζει την πλούσια σε γουανίνη αλληλουχία PAM (5'-NGG), ενώ έπειτα ταυτοποιεί την αλληλουχία του DNA-στόχου, η οποία βρίσκεται σε θέση ανοδικά της αλληλουχίας PAM, και προκαλεί τη διάσπασή του (Barman et al., 2020; Sternberg et al., 2014). Σαν αποτέλεσμα, ανοδικά της PAM οι κλώνοι υφίστανται κατευθυνόμενο διαχωρισμό, σχηματίζεται μία R-θηλιά και έπειτα ενσωματώνεται ο κλώνος του sgRNA. Κατά αυτό τον τρόπο διαμορφώνεται ένα ετερόδιπλο μόριο RNA-DNA (Barman et al., 2020). Το δίκλωνο μόριο δημιουργείται με το ζευγάρωμα βάσεων της διαχωριστικής αλληλουχίας του sgRNA μήκους 20 νουκλεοτιδίων (nt) και της πρωτοδιαχωριστικής αλληλουχίας του DNA-στόχου, λόγω της μεταξύ τους συμπληρωματικότητας (Barman et al., 2020). Ο τομέας νουκλεάσης HNH του ενζύμου Cas9 κόβει την αλληλουχία του DNA που εμφανίζει συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία στο RNA-οδηγό (πρόκειται για την αλληλουχία-στόχο). Ο τομέας νουκλεάσης RuvC από την άλλη κόβει την αλληλουχία η οποία δεν εμφανίζει συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία στο RNA-οδηγό (πρόκειται για την αλληλουχία-μη στόχο) (Barman et al., 2020; Jinek et al. 2012; Sapranauskas et al. 2011; Gasiunas et al. 2012). Οι δύο τομείς κόβουν το υβρίδιο DNA-RNA στην περιοχή που βρίσκεται 3 ζεύγη βάσεων ανοδικά της PAM και ως αποτέλεσμα προκαλείται δίκλωνη θραύση που αφήνει εκτεθειμένα «τυφλά» άκρα (Barman et al., 2020).



**Εικόνα 6 Ο μηχανισμός του φυσικού συστήματος CRISPR/Cas9 που συναντάται στους προκαρυώτες και η τροποποιημένη CRISPR/Cas9 τεχνολογία που χρησιμοποιείται για γονιδιωματική επεξεργασία.** Στα πλαίσια (1),(2),(3) παρουσιάζονται σχηματικά οι φάσεις της προσαρμογής, της έκφρασης και ωρίμανσης, και της παρεμβολής, αντίστοιχα. (1) Προσαρμογή: τα βακτήρια αποκτούν ειδικές γονιδιωματικές αλληλουχίες, οι οποίες ορίζονται ως «πρωτο-διαχωριστική αλληλουχία» ή 'protospacer', από φάγους και τις ενσωματώνουν στη συστοιχία CRISPR ως «διαχωριστική αλληλουχία» ή 'spacer'. (2) Έκφραση και ωρίμανση: η αλληλουχία 'leader' που βρίσκεται στην περιοχή CRISPR ξεκινά τη μεταγραφή της περιοχής, προκαλώντας την παραγωγή του tracrRNA, του ενζύμου Cas9 και του crRNA. (3) Παρεμβολή: με το ζευγάρι βάσεων μεταξύ crRNA και tracrRNA σχηματίζεται το υβρίδιο crRNA:tracrRNA και στη συνέχεια στρατολογείται η πρωτεΐνη Cas9. Το υβρίδιο καθοδηγεί την Cas9 να κόψει την πρωτο-διαχωριστική αλληλουχία και να την αποικοδομήσει. Η πρωτο-διαχωριστική αλληλουχία του βακτηριοφάγου ταυτοποιείται αφού είναι συμπληρωματική με τη διαχωριστική αλληλουχία του crRNA και έτσι προκαλείται ζευγάρι βάσεων μεταξύ τους. Όσον αφορά τη γονιδιωματική επεξεργασία (βλ. εικόνα κάτω δεξιά), το χιμαιρικό sgRNA δημιουργείται λόγω υβριδισμού μεταξύ των crRNA και tracrRNA. Το sgRNA αναγνωρίζει τις DNA αλληλουχίες-στόχους που βρίσκονται ανοδικά του PAM. Οι κλώνοι στο σημείο αυτό υπόκεινται σε κατευθυνόμενο διαχωρισμό και επέρχεται η ενσωμάτωση του κλώνου sgRNA.

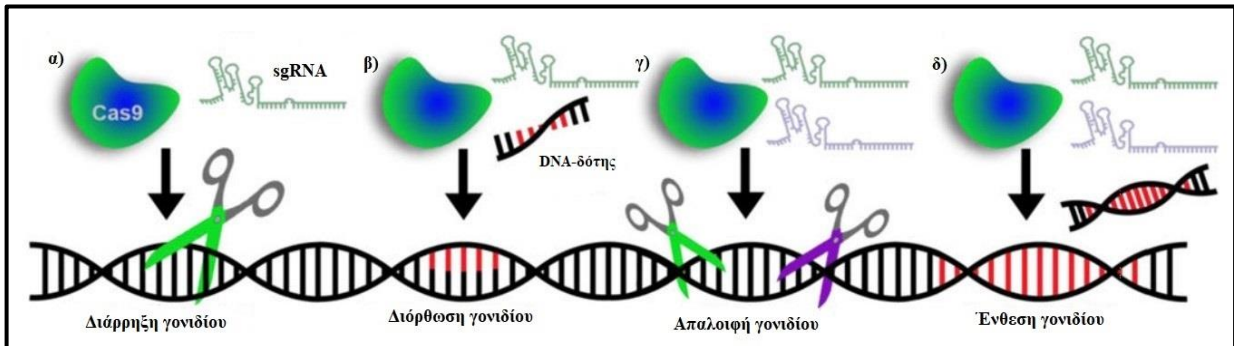


Σχηματίζεται στη συνέχεια το ετερόδιπλο μόριο RNA-DNA ως αποτέλεσμα του ζευγαρώματος βάσεων μεταξύ του sgRNA και της πρωτο-διαχωριστικής αλληλουχίας του DNA στόχου λόγω συμπληρωματικότητας. Οι τομείς της Cas9 κόβουν τις ειδικές και μη ειδικές DNA αλληλουχίες και προκαλούν δίκλωνες θραύσεις [Προσαρμογή από (Barman et al., 2020)].

Η πρόκληση δίκλωνης θραύσης ενεργοποιεί τους ενδογενείς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του κυττάρου. Αυτοί, προκειμένου να καλύψουν το κενό που δημιουργήθηκε, χρησιμοποιούν μια σειρά από ένζυμα (πολυμεράσες και λιγάσες) για την προσθήκη ή αφαίρεση νουκλεοτιδίων στο σημείο θραύσης. Ανάλογα με την επιθυμητή αλλαγή επί του γονιδίου, αξιοποιούνται και διαφορετικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης, με αποτελέσματα τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής: α) διάρρηξη (disruption), β) διόρθωση (correction), γ) ένθεση (insertion) και δ) απαλοιφή (deletion) (**Εικόνα 7**) (Nollette, 1985; Richards et al., 2018). Οι δίκλωνες θραύσεις που δημιουργούνται μέσω του συστήματος CRISPR μπορούν να επιδιορθωθούν μέσω δύο μηχανισμών που προαναφέρθηκαν, του HDR και του NHEJ (Ebrahimi & Hashemi et al., 2020; Bayat et al., 2017; Morrigan, 2015), με το μονοπάτι επιδιόρθωσης HDR να εμφανίζει συνήθως χαμηλότερη αποτελεσματικότητα από το NHEJ (Pickar-oliver et al., 2020).

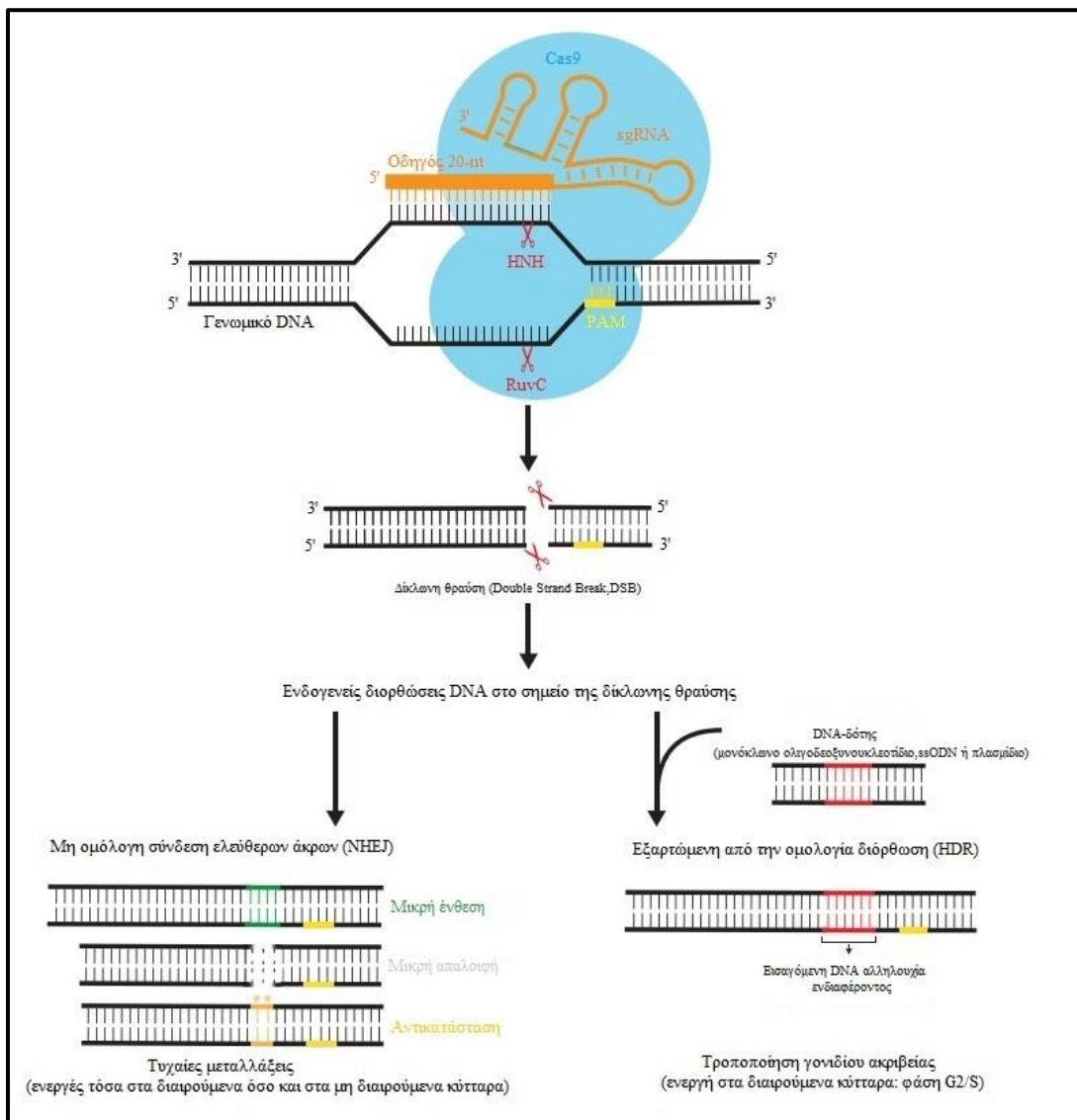
Ο μηχανισμός NHEJ είναι ένας φυσικός τρόπος επιδιόρθωσης του DNA και επούλωσης βλαβών που συναντάται στους περισσότερους οργανισμούς. Αποτελεί κύριο μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA σε κύτταρα θηλαστικών. Δεν απαιτεί την παρουσία πρότυπου DNA-δότη και χρησιμοποιεί μόνο περιορισμένα το ζευγάρι βάσεων (μικροομολογία) στα κομμένα άκρα (Ebrahimi & Hashemi et al., 2020; Scully et al., 2019). Έχει μελετηθεί αρκετά καλά στα βακτήρια, όπως στα *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* και *Mycobacteria*. Οι μηχανισμοί του NHEJ στους προκαρυώτες διαφέρουν από αυτούς των ευκαρυωτών (Ebrahimi & Hashemi et al., 2020; Cubbon et al., 2018). Για τους πρώτους πρόκειται για μία όχι και τόσο ισχυρή διαδικασία, που είτε δεν είναι αρκετή για την επιδιόρθωση των θραύσεων του DNA (όπως για παράδειγμα στο *B. subtilis* και στο *Mycobacterium smegmatis*), είτε δεν υφίσταται καθόλου (όπως για παράδειγμα στο στέλεχος K12 του *E. coli*) (Ebrahimi & Hashemi et al., 2020; Peters et al., 2015). Για τους δεύτερους, τους ευκαρυώτες, το μονοπάτι επιδιόρθωσης NHEJ συμβαίνει στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και διακόπτεται κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Η NHEJ είναι μία επιρρεπής σε λάθη διαδικασία και χαρακτηρίζεται από χαμηλή αξιοπιστία. Μπορεί να δημιουργήσει περιοχές 'indel' όπως ονομάζονται (δηλαδή μικρές και τυχαίες ενθέσεις ή απαλοιφές) μέσα στο γονίδιο σε κάποιο σημείο θραύσης, προκαλώντας έτσι μεταλλάξεις

μετατόπισης πλαισίου. Οι μεταλλάξεις τύπου 'indel' καθιστούν δυνατή την εξάλειψη της λειτουργίας ενός γονιδίου (Ebrahimi & Hashemi et al, 2020; Dev et al., 2018; Jakočiunas et al., 2016; Shen et al., 2017).



**Εικόνα 7 Πολλαπλά στοιχεία του συστήματος CRISPR/Cas9 φτάνουν στα κύτταρα για την επίτευξη μιας συγκεκριμένης λειτουργίας. (α) Η Cas9 και ένα RNA-οδηγός (sgRNA) για τη διάρρηξη γονιδίου (knock-out), (β) Η Cas9, ένα RNA-οδηγός και ένα πρότυπο κομμάτι μονόκλωνου DNA (ssDNA) για τη διόρθωση μετάλλαξης, (γ) Η Cas9 και δύο RNA-οδηγοί για την απαλοιφή γονιδίου, (δ) Η Cas9, ένα RNA-οδηγός και ένα πρότυπο κομμάτι DNA για την ένθεση γονιδίου (knock-in) [Προσαρμογή από ((Richards et al., 2018)].**

Από την άλλη, ο μηχανισμός HDR απαιτεί την παρουσία πρότυπου DNA-δότη για να επιδιορθώσει τη δίκλωνη θραύση με υψηλή αξιοπιστία αλλά ταυτόχρονα με χαμηλή επίπτωση. Στη διαδικασία αυτή, ένα ομόλογο αλληλόμορφο ή ένα εξωγενές πρότυπο DNA, το οποίο εμφανίζει ομολογία με παρακείμενες περιοχές δίκλωνης θραύσης, χρησιμοποιείται για να κατευθύνει την πέψη του DNA από τη νουκλεάση Cas9. Η αποτελεσματικότητα της γονιδιωματικής επεξεργασίας εξαρτάται από τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους παράδοσης και τους κυτταρικούς τύπους (Ebrahimi & Hashemi et al., 2020; Mitsunobu et al., 2017; Savic et al., 2018). Το μονοπάτι HDR είναι απαραίτητο για τεχνικές γονιδιωματικής επεξεργασίας με υψηλή ακρίβεια, όπως είναι η αντικατάσταση γονιδίου, η απενεργοποίηση γονιδίου (gene knock-out), οι σημειακές μεταλλάξεις και η τεχνική που περιλαμβάνει τη μοναδική αντικατάσταση πληροφοριών αλληλουχίας DNA σε έναν γενετικό τόπο ή την εισαγωγή πληροφοριών αλληλουχίας που δεν υπήρχαν στον τόπο αυτόν (gene knock-in). Στους ευκαρυώτες, ο μηχανισμός HDR λαμβάνει χώρα μόνο στις φάσεις S και G2 του κυτταρικού κύκλου, όταν δηλαδή οι αδελφές χρωματίδες ή τα ομόλογα χρωμοσώματα είναι διαθέσιμα για την αξιοποίησή τους ως πρότυπα (Ebrahimi & Hashemi et al., 2020; Tang et al., 2019) (**Εικόνα 8**).



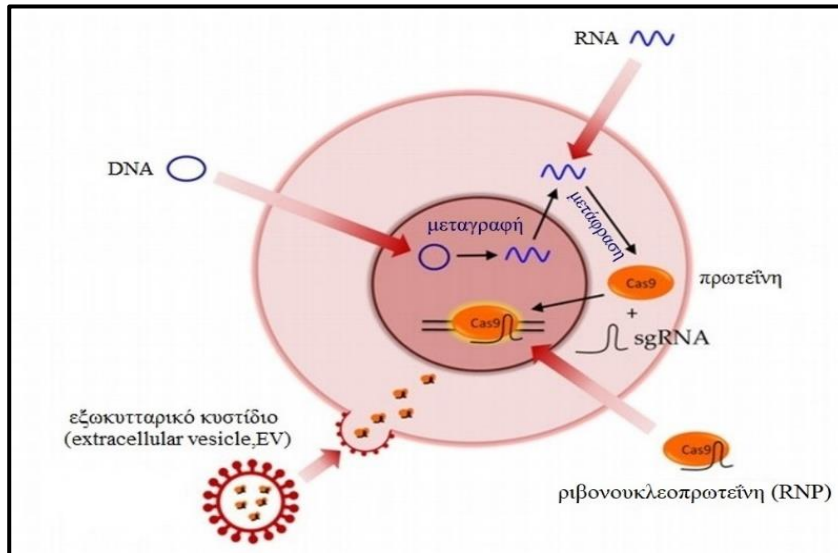
**Εικόνα 8** Πρόκληση δίκλωνων θραύσεων στο DNA από το σύστημα CRISPR/Cas9 και τα δύο μονοπάτια (NHEJ και HDR) που ηγούνται της επιδιόρθωσης τους [Προσαρμογή από (Jiang & Doudna et al., 2017)].

## 2.7. Μέθοδοι παράδοσης του συστήματος CRISPR/Cas9

### 2.7.1 Εισαγωγή

Η παράδοση των συστατικών στοιχείων του συστήματος CRISPR/Cas9 μέσα στον πυρήνα των κυττάρων-στόχων είναι απαραίτητη ώστε να προκύψει αποτελεσματική γονιδιωματική επεξεργασία (Al et al., 2018) και είναι γεγονός πως αποτελεί μία πρόκληση. Η πρωτεΐνη Cas9 έχει μοριακό βάρος περίπου 160 kDa (Jinek et al., 2014; Yip et al., 2020), είναι θετικά φορτισμένη (Lino et al., 2018; Sun et al., 2015), όμως μετά το σχηματισμό του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου, ο μακρύς σκελετός των φωσφορικών ομάδων του sgRNA αποδίδει ένα καθαρά αρνητικό φορτίο στο σύμπλοκο (Bei et al., 2017a; Yip et al., 2020). Τα προαναφερόμενα χαρακτηριστικά αποτελούν τροχοπέδη για τη διέλευση του συμπλόκου Cas/RNP από τη μεμβράνη. Επιπλέον, με την είσοδό τους στο εσωτερικό των κυττάρων, τόσο η πρωτεΐνη Cas9 όσο και το sgRNA θα πρέπει να επιβιώσουν έναντι των μηχανισμών αποικοδόμησης που διαθέτουν τα κύτταρα, και στη συνέχεια να μετακινηθούν στον πυρήνα, όπου θα μπορέσει να λάβει χώρα η γονιδιωματική επεξεργασία. Για τους λόγους αυτούς, η επιλογή της κατάλληλης στρατηγικής μεθόδου παράδοσης των βασικών στοιχείων του συστήματος CRISPR/Cas9 είναι κριτικής σημασίας προκειμένου να επιτευχθεί ακριβής και αποτελεσματική γονιδιωματική επεξεργασία (Yip et al., 2020).

Οι μορφές με τις οποίες δύναται να μεταφερθεί η πληροφορία σχετικά με την πρωτεΐνη Cas9 είναι οι εξής: DNA, mRNA ή πρωτεΐνη (**Εικόνα 9**). Η κάθε μορφή διαθέτει θετικά και αρνητικά στοιχεία. Αναλυτικότερα, η παράδοση της Cas9 υπό τη μορφή πλασμιδιακού DNA αποτελεί μία οικονομικά αποδοτική λύση. Για την προετοιμασία του πλασμιδίου δεν απαιτείται εξειδικευμένος εργαστηριακός εξοπλισμός. Επιπλέον, με αυτό τον τρόπο παράδοσης η έκφραση της πρωτεΐνης στα κύτταρα είναι παρατεταμένη. Αυτό μπορεί να λειτουργήσει πλεονεκτικά σε περίπτωση που απαιτείται παρατεταμένη έκφραση για τη γονιδιωματική επεξεργασία. Παρόλα αυτά, επειδή ο σχεδιασμός αυτός προϋποθέτει τη μεταγραφή και μετάφραση για τη σύνθεση της πρωτεΐνης Cas9, η διαδικασία της επεξεργασίας αργεί πολύ περισσότερο σε σχέση με τις μορφές mRNA και πρωτεΐνης. επίσης, η παρατεταμένη έκφραση της Cas9 στα κύτταρα, αν και εν μέρει ευεργετική, αυξάνει την πιθανότητα γονιδιωματικής επεξεργασίας εκτός της περιοχής-στόχου (Wu et al., 2014; Yip et al., 2020). Τέλος, το πλασμιδιακό DNA θέτει τον κίνδυνο της παρεμβαλλόμενης μεταλλαξιγένεσης



**Εικόνα 9 Η παράδοση της Cas9 μπορεί να γίνει με τη μορφή DNA, mRNA ή πρωτεΐνης.** Ο σχεδιασμός της πρωτεΐνης καθιστά δυνατή την άμεση δράση της Cas9 όταν εκείνη βρίσκεται στον πυρήνα. Η μεταγωγή εξωκυτταρικών κυστιδίων απελευθερώνει προ-φορτωμένα RNP μέσα στα κύτταρα για αποτελεσματική γονιδιαμιακή επεξεργασία [Προσαρμογή από (Yip et al., 2020)].

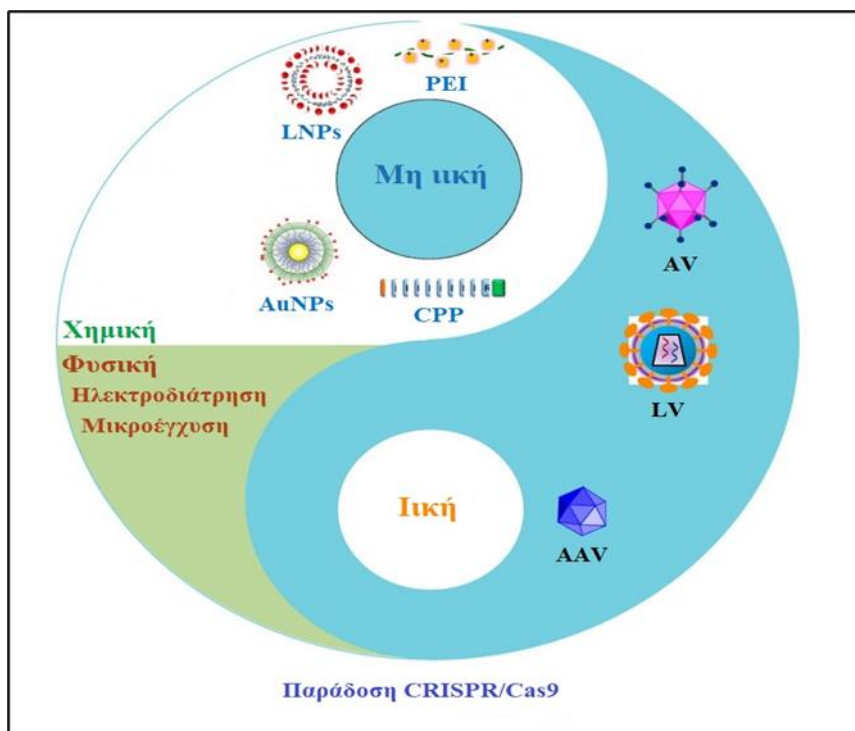
Η παράδοση υπό τη μορφή ενός mRNA υποκινεί γρηγορότερη επεξεργασία σε σχέση με την πλασμιδιακή μορφή, αφού το στάδιο της μεταγραφής παραλείπεται. Παρόλα αυτά, το mRNA αποτελεί ένα εξαιρετικά ασταθές μόριο, ευάλωτο σε αποικοδόμηση από τις RNAάσες<sup>7</sup>. Έτσι, ο σχεδιασμός αυτός επιτρέπει την παροδική έκφραση της πρωτεΐνης Cas9. Διατίθενται βέβαια χημικές τροποποιήσεις προκειμένου να ενισχυθεί η σταθερότητα του μορίου mRNA μετά την παράδοση (Yin et al., 2018; Yip, 2020). Η παροδική έκφραση της πρωτεΐνης που παρέχει το πρότυπο αυτό μπορεί να υποβαθμίζει την αποτελεσματικότητα της γονιδιαμιακής επεξεργασίας, όμως μειώνει τα περιστατικά δράσης εκτός της περιοχής-στόχου (Wu et al., 2014; Yip et al., 2020).

Τέλος, η παράδοση της Cas9 υπό τη μορφή πρωτεΐνης καθιστά δυνατή την άμεση γονιδιαμιακή επεξεργασία στον πυρήνα, και γι' αυτό η αποτελεσματικότητά της είναι υψηλότερη από εκείνη που προσφέρουν οι προαναφερόμενοι σχεδιασμοί των μορίων DNA και mRNA. Βέβαια, η παράδοση της Cas9 υπό τη μορφή πρωτεΐνης στα κύτταρα αποτελεί τη μέθοδο με τον πιο παροδικό χαρακτήρα σε σχέση με τις άλλες δύο. Η πιθανότητα επεξεργασίας εκτός της περιοχής-στόχου παραμένει χαμηλή (Liang et al., 2015; Yip et al., 2020), ενώ το κόστος παράδοσης σε αυτή την περίπτωση είναι υψηλότερο από την αντίστοιχη παράδοση υπό τη μορφή DNA ή mRNA.

<sup>7</sup> Οι ριβονουκλεάσες ή αλλιώς RNAάσες είναι μια ομάδα ενζύμων τα οποία διασπούν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στα μόρια RNA προκαλώντας σημαντικά διαφορετικές βιολογικές συνέπειες (W. C. Kim & Lee et al., 2009).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η παράδοση της πρωτεΐνης Cas9, η οποία είναι βακτηριακής προέλευσης, μέσα στα κύτταρα μπορεί να επάγει τη συμεταφορά βακτηριακής ενδοτοξίνης, η οποία με τη σειρά της δύναται να πυροδοτήσει σοβαρές ανοσολογικές αντιδράσεις. Η παράμετρος αυτή αποτελεί ένα βασικό λόγο ανησυχίας όσον αφορά την ασφάλεια χρήσης της Cas9 σε κλινικές δοκιμές (Yip et al., 2020; You et al., 2019).

Μέχρι σήμερα, οι στρατηγικές που είναι διαθέσιμες για την παράδοση της Cas9 ταξινομούνται σε δύο τύπων προσεγγίσεις: εκείνες που βασίζονται σε ικούς φορείς σε αντιδιαστολή με εκείνες που βασίζονται σε μη ικούς φορείς. Γενικά οι προσεγγίσεις που στηρίζονται σε μη ικούς φορείς περιλαμβάνουν φυσικές και χημικές μεθόδους (**Εικόνα 10**). Εκτός από τις δύο αυτές κατηγορίες γίνεται λόγος και για ένα άλλο είδος φορέα, τα εξωκυτταρικά κυστίδια (Extracellular Vesicles, EVs), τα οποία ομοιάζουν με ιούς από τους οποίους λείπει το γονιδίωμα. Έτσι, η στρατηγική παράδοσης που βασίζεται σε αυτά αποτελεί ουσιαστικά ένα συνονθύλευμα των προσεγγίσεων με χρήση ικών ή μη φορέων, ενώ διαθέτει τα πλεονεκτήματα και των δύο αυτών μεθόδων (Yip et al., 2020).



**Εικόνα 10** Σχηματική αναπαράσταση των μεθόδων παράδοσης του συστήματος CRISPR/Cas9. Χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, την ική και τη μη ική παράδοση, με την τελευταία να διαιρείται σε χημική και φυσική [Προσαρμογή από (H. X. Wang et al., 2017)].

### 2.7.2. Ιικοί φορείς

Η παράδοση με τη χρήση ικών φορέων επιτυγχάνεται μέσω δύο μηχανισμών, αυτών της μόλυνσης και της αντιγραφής. Κατά τη διάρκεια του σταδίου της μόλυνσης, ο ιός αναγνωρίζει και εισέρχεται μέσα σε ένα συγκεκριμένο κύτταρο και το γονιδιώμά του εισέρχεται είτε στον πυρήνα (αν πρόκειται για DNA ιό), είτε στο κυτταρόπλασμα (αν πρόκειται για RNA ιό) για να πολλαπλασιαστεί. Με το τέλος του πολλαπλασιασμού του ικού γονιδιώματος στα κύτταρα, τα ικά σωματίδια (virions) που παρήχθησαν εξέρχονται από τα κύτταρα. Το στάδιο της μόλυνσης ξεκινά ξανά σε γειτονικά κύτταρα και έτσι ο κύκλος μόλυνσης-αντιγραφής επαναλαμβάνεται. Ο ιός που περιέχει το υλικό προς παράδοση (την επεξεργασμένη δηλαδή νουκλεάση για τη μετέπειτα γονιδιωματική επεξεργασία) μεταφέρεται στα κύτταρα-στόχους, και έτσι η γονιδιακή θεραπεία είναι εφικτή (Chandrasekaran et al., 2018; Vannucci et al., 2013).

Ορισμένοι από τους ικούς φορείς που έχουν αναπτυχθεί είναι οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί (Adeno-Associated Viruses, AAVs), οι λεντοϊοί (Lentiviruses, LVs) και οι αδενοϊοί (Adenoviruses, AVs).

#### 2.7.2.1. Αδενο-σχετιζόμενοι ιοί (Adeno-Associated Viruses, AAVs)

Οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί αποτελούν έναν πολύ κοινό ικό φορέα που χρησιμοποιείται για την παράδοση γονιδίων. Παρουσιάζουν μοναδικές ιδιότητες οι οποίες εγείρουν μεγάλο ενδιαφέρον σχετικά με την προοπτική χρήσης τους ως «οχημάτων» παράδοσης, ιδιαίτερα σε *in vivo* εφαρμογές. Συγκεκριμένα, δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα, εμφανίζουν χαμηλή ανοσογονικότητα στους ανθρώπους και είναι μη αντιγραφικοί (Carter et al., 2004; Yip et al., 2020). Μετά τη μεταγωγή, τα γονιδιώματα αυτών παραμένουν επισωμικά στον πυρήνα, και σταδιακά απαλείφονται μέσω της κυτταρικής διαίρεσης. Συνεπώς, η επισωμική παράδοση διαγονιδίων με τους ικούς αυτούς φορείς παρέχει μία ασφαλή επιλογή για παροδική έκφραση των γονιδίων (Daya & Berns et al., 2008; Yip et al., 2020).

Το σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί να παραδοθεί μέσω των αδενο-σχετιζόμενων ιών με δύο τρόπους. Αρχικά, οι AAVs μπορούν να λειτουργήσουν σαν «οχήματα» για την παράδοση Cas9, sgRNA και/ή προτύπων δότη μέσα στα κύτταρα, μέσω της διαδικασίας της μεταγωγής. Εκτός από τις *in vivo* εφαρμογές, οι AAVs αποτελούν διαδικασία εκλογής

και σε *in vitro* εφαρμογές, ειδικά όταν υπάρχει ανησυχία σχετικά με την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα, και όταν η μέθοδος της ηλεκτροπόρωσης δεν αποτελεί βιώσιμη επιλογή για το συγκεκριμένο τύπο κυττάρου. Παρόλα αυτά, αυτοπεριορίζονται λόγω της χαμηλής ικανότητάς τους για κλωνοποίηση (<47 kb). Ωστόσο, δεν αποκλείεται η χρήση δύο ξεχωριστών AAV φορέων, όπως για παράδειγμα συνέβη σε μελέτη για τη μεταβολική νόσο του ήπατος στα ποντίκια, όπου χρησιμοποιήθηκε ένας φορέας AAV που εξέφραζε την πρωτεΐνη Cas9 και ένας δεύτερος που έφερε τις αλληλουχίες του sgRNA και του DNA-δότη, προκειμένου να επιτευχθεί η επεξεργασία του γονιδίου (Yang et al., 2016; Yip et al., 2020).

Η παράδοση της πολύ συχνά χρησιμοποιούμενης Cas9 του *S. pyogenes* από τους AAVs αποτελεί πρόκληση εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους της (περίπου 4.2 kb). Ένα μικρότερο στέλεχος της Cas9 από τον *Staphylococcus aureus* (απαντάται με την ονομασία SaCas9 και έχει μέγεθος περίπου 3.15 kb) αποτελεί μία πιο εύκολα εφαρμόσιμη επιλογή (Yip, et al., 2020). Παρόλα αυτά, μειονεκτεί ως προς τη διαθεσιμότητα των κατάλληλων αλληλουχιών PAM για τη στόχευση (D. Ma et al., 2019; Yip et a., 2020). Δευτερευόντως, ένας άλλος τρόπος αξιοποίησης των φορέων AAV είναι ο ορισμός τους ως προτύπων δότη με στόχο την εισαγωγή γονιδίου μέσω του μονοπατιού HDR (Yip, 2020).

Η αποτελεσματικότητα της εισαγωγής προτύπων δότη σε AAV είναι υψηλότερη από αυτή των μη ικών μεθόδων στόχευσης. Ομοίως, η χαμηλή ικανότητα κλωνοποίησης των ανασυνδυασμένων AAV μπορεί να παρακαμφθεί χωρίζοντας μεγάλα σε μέγεθος διαγονίδια σε δύο ξεχωριστούς φορείς AAV, προκειμένου να είναι εφικτός ο διαδοχικός ομόλογος ανασυνδυασμός (Yip et al., 2020). Ένα μειονέκτημα των AAV είναι ότι παρουσιάζουν χαμηλή αποτελεσματικότητα στη γονιδιωματική επεξεργασία, καθώς ο εξειδικευμένος ομόλογος ανασυνδυασμός συμβαίνει περίπου μόνο στο 0.1% έως 1% του συνόλου του κυτταρικού πληθυσμού, και αυτό μόνο υπό τις βέλτιστες συνθήκες (Deyle & Russell et al., 2009; Yip et al., 2020). Ωστόσο, η παράδοση που βασίζεται σε φορείς AAV αναμένεται να γίνει ολοένα και πιο δημοφιλής, και γι' αυτό αναμένονται κλινικές μελέτες γονιδιωματικής επεξεργασίας με χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 που θα βασίζει την παράδοσή του σε φορείς τύπου AAV (Yip et al., 2020; Kotterman et al., 2015).



### 2.7.2.2. Λεντοϊοί (Lentiviruses, LVs)

Οι λεντοϊοί αποτελούν άλλον ένα τύπου ιικού φορέα για την παράδοση του συστήματος CRISPR/Cas9, ενώ πρόκειται για υπότυπο των ρετροϊών. Οι λεντοϊοί περιέχουν ένα μονόκλωνο γονιδίωμα RNA, το οποίο μετατρέπεται σε DNA στο μεταγόμενο κύτταρο από ένα ένζυμο που κωδικοποιείται από τους ίδιους τους ιούς, την αντίστροφη μεταγραφάση (Milone & O'Doherty et al., 2018).

Οι φορείς LV διαθέτουν ικανότητα κλωνοποίησης (< 8 kb) σε πιο ικανοποιητικό βαθμό σε σχέση με τους φορείς AAV. Καθίσταται έτσι δυνατή η κλωνοποίηση της Cas9 και του sgRNA με τη χρήση ενός μόνο φορέα LV. Παράλληλα, η διαδικασία παραγωγής τους είναι πιο εύκολη σε σχέση με τη διαδικασία παραγωγής των AAV. Η μεταγωγή του λεντοϊού είναι μια υψηλά αποτελεσματική διαδικασία σε μία ευρεία ποικιλία κυτταρικών τύπων, τόσο σε διαιρούμενα όσο και σε μη διαιρούμενα κύτταρα. Τα πλεονεκτήματα αυτά ανάγουν τους LV φορείς στο βέλτιστο «όχημα» για την παράδοση τόσο *in vitro* όσο και *ex vivo* (Yip et al., 2020; Kotterman et al., 2015).

Παρά τα θετικά που αναφέρθηκαν, η χρήση τους θεωρείται πρόκληση εξαιτίας της τυχαίας ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα του εκάστοτε κυττάρου-ξενιστή με το οποίο σχετίζονται. Μία ενδεχόμενη ενσωμάτωση των LV στην περιοχή κοντά στα ογκογονίδια μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίησή τους, προκαλώντας ογκογένεση (Yip et al., 2020; Popescu et al., 1990). Η πιθανότητα αυτή αποκλείει τη χρήση της μεσολαβούμενης από LV παράδοση του συστήματος CRISPR/Cas9 για *in vivo* γονιδιωματική σε κλινικές δοκιμές (Yip et al., 2020; Rothe et al., 2013). Μάλιστα, έχουν καταγραφεί αρκετά δυσάρεστα περιστατικά σε κλινικές δοκιμές εξαιτίας εισαγόμενων μεταλλάξεων που προκαλούνται από ρετροϊούς (Check, 2005; Check et al., 2002; Yip et al., 2020), αποδεικνύοντας έτσι τον κίνδυνο που ενέχει η χρήση λεντοϊών σε ασθενείς. Μερική λύση στο πρόβλημα και αύξηση της ασφάλειας της μεταγωγής των LVs μπορεί να δώσει η ανάπτυξη λεντοϊών ελαττωματικών ως προς την ενσωμάτωσή τους σε πλασμίδια που εκφράζουν μεταλλαγμένη ιντεργκράση (Yip et al., 2020; Liu et al., 2014). Παρόλα αυτά, ένα μεταβλητό επίπεδο ενσωμάτωσης θα συνεχίσει να συμβαίνει, και όπως φαίνεται δε μπορεί να αποφευχθεί εντελώς (Banasik et al., 2010; Yip et al., 2020).

### **2.7.2.3. Αδενοϊοί (Adenoviruses, AVs)**

Τελευταία κατηγορία ικών φορέων που χρησιμοποιείται συχνά σε κλινικές δοκιμές για την παράδοση γονιδίου αποτελούν οι αδενοϊοί (Lee et al., 2017; Yip et al., 2020). Μετάγουν τόσο διαιρούμενα όσο και μη διαιρούμενα κύτταρα, και δεν ενσωματώνονται στα γονιδιώματα του κυττάρου-ξενιστή. Η πρόκληση όσον αφορά αυτό το είδος φορέων για παράδοση είναι πως πυροδοτούν σε υψηλό βαθμό αντιδράσεις φυσικής ανοσίας στα κύτταρα-ξενιστές. Αυτό προκαλεί φλεγμονή των ιστών και διαδοχική απόρριψη των φορέων (Yip et al., 2020; Muruve et al., 2004). Η παραγωγή τους είναι επίσης πολύπλοκη διαδικασία (Imperial & Kochanek et al., 2004; Yip et al., 2020), γεγονός που αποτελεί τροχοπέδη στην ευρεία εφαρμογή και αποτελεσματικότητα της στρατηγικής αυτής.

### **2.7.3. Μη ιικοί φορείς**

Αρκετά συστήματα παράδοσης που χρησιμοποιούν μη ιικούς φορείς έχουν αναπτυχθεί και επιστρατεύονται επιτυχώς για τη μεταφορά του συστήματος CRISPR/Cas9 στα κύτταρα. Τα κύρια πλεονεκτήματα των μη ικών φορέων είναι ότι: 1) μπορούν να «φιλοξενήσουν» και να μεταφέρουν γενετικά στοιχεία μεγάλου μεγέθους, 2) η παραγωγή τους είναι εύκολη, και 3) η χρήση τους είναι σχεδόν ακίνδυνη. Αυτοί οι λόγοι ωθούν πολλούς επιστήμονες στην επιλογή της στρατηγικής αυτής για την παράδοση νουκλεασών. Ορισμένες από τις πιο αξιοσημείωτες μεθόδους περιγράφονται ακολούθως.

#### **2.7.3.1. Φυσικές μέθοδοι**

##### **2.7.3.1.1. Μικροέγχυση**

Μικροέγχυση αποκαλείται η φυσική μέθοδος έγχυσης Cas9 και μορίων sgRNA απευθείας μέσα στα κύτταρα, με τη χρήση μικροσκοπίου και βελόνας. Με τη μέθοδο αυτή, το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης Cas9, το οποίο είχε τεθεί ως σύνηθες πρόβλημα στις προαναφερθείσες στρατηγικές με ιικούς φορείς, δεν αποτελεί εμπόδιο. Αυτό συμβαίνει γιατί η βελόνα που χρησιμοποιείται διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και εναποθέτει τα

συστατικά μέσα στον πυρήνα. Επιπλέον, η χειροκίνητη έγχυση επιτρέπει τον έλεγχο της δοσολογίας των «φορτίων» που εισέρχονται στα κύτταρα.

Βέβαια η μέθοδος χαρακτηρίζεται από πολυπλοκότητα και από υψηλό επίπεδο τεχνικής δυσκολίας. Αποδίδεται έτσι ως τεχνική με χαμηλή διεκπεραιωτική ικανότητα. Παράλληλα η επιτακτική ανάγκη για χρήση μικροσκοπίου για την έγχυση την αποκλείει από *in vivo* εφαρμογές σε ασθενείς. Μάλιστα, οι περισσότερες εφαρμογές μικροέγχυσης παρατηρούνται σε ζυγωτά ζώων για την παραγωγή διαγονιδιακών πρότυπων ζώων (Horii et al., 2014; Y. Ma, Shen, et al., 2014; Olson, 2015; Yip et al., 2020).

### **2.7.3.1.2. Ηλεκτροπόρωση (Electroporation)**

Η ηλεκτροπόρωση (ή αλλιώς ηλεκτροδιάτρηση) αποτελεί μία πολύ δημοφιλή φυσική μέθοδο παράδοσης. Η τεχνική εφαρμόζει παλμούς ηλεκτρικού ρεύματος προκειμένου να προκαλέσει παροδικό άνοιγμα πόρων στην κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας έτσι την παράδοση των «φορτίων» μέσα στα κύτταρα. Αποτελεί συχνή επιλογή για γονιδιωματική επεξεργασία *in vitro* και *ex vivo*, επειδή ακριβώς είναι ικανή να μεταφέρει «φορτία» σε μια ευρεία ποικιλία κυτταρικών τύπων. Το χαρακτηριστικό της αυτό την κάνει να υπερτερεί σε σχέση με τις μεθόδους διαμόλυνσης, οι οποίες συνήθως παρακαλούνται σε δύσκολα διαμολυνόμενους κυτταρικούς τύπους, όπως είναι για παράδειγμα τα αρχέγονα κύτταρα. Αξίζει να αναφερθεί πως η μεσολαβούμενη από ηλεκτροπόρωση *ex vivo* γονιδιωματική επεξεργασία προήγαγε την ανάπτυξη θεραπειών με βλαστοκύτταρα, ιδιαίτερα για τη θεραπεία αιματολογικών κακοηθειών (Romero et al., 2018; Dever et al., 2018; Yip et al., 2020). Τα αιμοποιητικά βλαστικά/προγονικά κύτταρα του ασθενή, αφού υποστούν τροποποίηση *ex vivo*, μεταμοσχεύονται εκ νέου στον ασθενή προκειμένου να δράσουν θεραπευτικά (Yip et al., 2020; Romero et al., 2018).

Παρά το γεγονός ότι είναι πλέον διαθέσιμες *in vivo* συσκευές ηλεκτροπόρωσης, και ενώ έχει καταγραφεί πως έχουν φέρει εις πέρας γονιδιωματική επεξεργασία σε ζώα (Saito et al., 2006; Boon & Wijnholds et al., 2017; Q. Li et al., 2018; Yip et al., 2020), η εφαρμογή της μεθόδου αυτής για *in vivo* γονιδιωματική επεξεργασία σε ασθενείς δεν είναι γενικώς εφαρμόσιμη. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι οι αναλογίες Cas9/sgRNA οφείλουν να είναι βελτιστοποιημένες και οι συνθήκες ηλεκτροπόρωσης προσαρμοσμένες στον εκάστοτε κυτταρικό τύπο, καθιστά τη μέθοδο αυτή ιδιαίτερα ακριβή. Τέλος, σημαντικό είναι να σημειωθεί πως το ισχυρό ηλεκτρικό ρεύμα που εφαρμόζεται οδηγεί σε υψηλό

ποσοστό κυτταρικού θανάτου. Αυτό υποδεικνύει ότι ενδεχομένως να μην είναι η κατάλληλη μέθοδος για κύτταρα που είναι ευαίσθητα σε καταπονήσεις

### **2.7.3.1.2.3. Χημικές μέθοδοι**

#### **2.7.3.1.2.3.1. Νανοσωματίδια λιπιδίων (lipid-based nanoparticles, LNPs)**

Τα νανοσωματίδια λιπιδίων χρησιμοποιούνται συχνά για τη μεταφορά νουκλεϊκών οξέων και μπορούν να προστατεύσουν το παραδιδόμενο φορτίο από την αποικοδόμησή του έως ένα βαθμό, ενώ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην παράδοση στοιχείων του συστήματος CRISPR/Cas9 μέσα στα κύτταρα (X. Xu et al., 2019).

Πρόκειται για σφαιρικές δομές αποτελούμενες από διπλοστιβάδα λιπιδίων, η οποία σχηματίζεται σε υδατικά διαλύματα. Το αρνητικό φορτίο των νουκλεϊκών οξέων αλλά και των κυτταρικών μεμβρανών δημιουργεί απωθητικές δυνάμεις μεταξύ τους που λειτουργούν ανασταλτικά για την είσοδο των νουκλεϊκών οξέων μέσα στα κύτταρα. Η ενθυλάκωση λοιπόν αρνητικά φορτισμένων νουκλεϊκών οξέων μέσα σε θετικά φορτισμένα λιποσώματα διευκολύνει τη σύντηξη των συμπλόκων κατά μήκος των κυτταρικών μεμβρανών και συνεπώς την είσοδό τους μέσα στα κύτταρα (Yip et al., 2020; Pensado et al., 2014). Καθώς η παράδοση του συστήματος CRISPR/Cas9 μπορεί να γίνει υπό τη μορφή DNA, mRNA (Cas9 και sgRNA) ή πρωτεΐνης (RNP), οι παράγοντες αυτοί μπορούν να ενθυλακωθούν στα λιποσώματα αυτά (Horii et al., 2013; Hu et al., 2015; Liang et al., 2015; Sakuma et al., 2014; Schwank et al., 2013; Yip et al., 2020).

Το sgRNA διαθέτει αρνητικό φορτίο, ενώ οι πρωτεΐνες Cas9 είναι φορτισμένες θετικά. Τα σύμπλοκα Cas9/sgRNA είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω του πλεονάζοντος αρνητικού φορτίου που φέρει το sgRNA. Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των λιπιδίων και του «φορτίου» καθοδηγεί το σχηματισμό ριβονουκλεοπρωτεϊνών φορτωμένων με λιποσώματα, σε κάποιο βαθμό. Το κατιονικό λιποσώμα διαθέτει το πλεονέκτημα της ευνοϊκής αλληλεπίδρασης με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη, και έτσι τα νουκλεϊκά οξέα ενθυλακώνονται με μεγαλύτερη ευκολία. Για την απελευθέρωση του «φορτίου» που μεταφέρουν οι φορείς λιπιδίων στο εσωτερικό του κυττάρου, κρίνεται απαραίτητη η αλληλεπίδραση του κατιονικού λιποσώματος και της κυτταρικής μεμβράνης (Basha et al., 2011; X. Xu et al., 2019).

Μέχρι σήμερα το αντιδραστήριο της λιποφεκταμίνης (lipofectamine) αποτελεί τη δημοφιλέστερη επιλογή για το σχηματισμό νανοσωματιδίων λιπιδίων (Horii et al., 2013;

Hu et al., 2015; Liang et al., 2015; Sakuma et al., 2014; Schwank et al., 2013; Yip et al., 2020). Μη λιπιδικά πολυμερή αντιδραστήρια όπως η πολυαιθυλενιμίνη και η πολυ-L-λυσίνη χρησιμοποιούνται εξίσου συχνά για την παραγωγή νανοσωματιδίων (Yip, 2020; Zhen et al., 2015; Zuckermann et al., 2015). Τα πολυμερικά αυτά αντιδραστήρια μεσολαβούν στην ενθυλάκωση των «φορτίων» του συστήματος CRISPR/Cas9 μέσα σε θετικά φορτισμένα σύμπλοκα, ούτως ώστε να επιτραπεί στη συνέχεια η ενδοκύττωσή τους (Yip et al., 2020).

Τα θετικά χρήσης της μεθόδου αυτής είναι πως επειδή ακριβώς δεν εμπλέκονται ιοί στην παράδοση των συστατικών στοιχείων του συστήματος CRISPR/Cas9, αποτελεί πιο ασφαλή επιλογή. Η στρατηγική των λιπιδικών νανοσωματιδίων προκαλεί καταπόνηση στα κύτταρα, αλλά σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης. Επιπλέον, η μέθοδος έχει εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων της Αμερικής (US Food and Drug Administration, US FDA) για τη μεταφορά φαρμάκων (Allen & Cullis et al., 2013; Yip et al., 2020). Τόσο πολυμερικά όσο και λιπιδικά αντιδραστήρια έχουν αξιοποιηθεί για την παράδοση του συστήματος CRISPR/Cas9 σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών ( Yip et al., 2020).

Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου διαμόλυνσης, η οποία βασίζεται αποκλειστικά στο ενδοσωμικό μονοπάτι είναι χαμηλή και υστερεί αν συγκριθεί με αυτή των μεθόδων της ικκής επιμόλυνσης και της ηλεκτροπόρωσης (Eiges et al., 2001; Moore et al., 2005; Yip et al., 2020).

#### **2.7.3.1.2.3.2. Πεπτίδια που διεισδύουν στα κύτταρα (Cell-Penetrating Peptides, CPPs)**

Τα πεπτίδια που διεισδύουν στα κύτταρα απαρτίζονται από μία τάξη κατιονικών πεπτιδίων, τα οποία είναι εξαιρετικά ενεργά, λαμβάνοντας υπόψιν και τον τρόπο που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη. Ανακαλύφθηκαν πρώτα στους ιούς, και θεωρούνται τομείς μεταγωγής πρωτεϊνών. Εξαιτίας του θετικού τους φορτίου και της ιδιότητάς τους να διεισδύουν στο κύτταρο χρησιμοποιούνται για να ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα της ενδοκυτταρικής παράδοσης μέσω της σύζευξής τους με πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα (X. Xu et al., 2019). Τα CPPs μπορούν να βρεθούν συζευγμένα ξεχωριστά με την Cas9 και τα sgRNA (Suresh et al., 2017; Yip et al., 2020) ή, όπως συμβαίνει τις περισσότερες φορές, να βρεθούν συζευγμένα μόνο με την πρωτεΐνη Cas9. Στη δεύτερη περίπτωση ακολουθεί

συμπλοκοποίηση με τα sgRNA ώστε να σχηματιστούν RNPs πριν την παράδοση (Ngwa et al., 2017; Suresh et al., 2017; Yip et al., 2020).

Τα CPPs προσφέρουν μια φαινομενικά πιο ασφαλή λύση για την παράδοση του Cas RNP εφόσον η τυχαία ενσωμάτωση αλλά και η εισαγόμενη μεταλλαξιγένεση δεν αποτελούν παράγοντες κινδύνου. Παρόλα αυτά η βασιζόμενη στα CPPs παράδοση καθίσταται αναποτελεσματική συγκρινόμενη με αυτή των ιικών και φυσικών μεθόδων, με αποτέλεσμα να προσφέρουν γονιδιωματική επεξεργασία χαμηλού ποσοστού (Lino et al., 2018; Yip et al., 2020). Μπορεί τα CPPs να αποτελούν καλή λύση για γονιδιωματική επεξεργασία *in vitro* και *ex vivo* (Henriques et al., 2005; Presente et al., 2013; Lim et al., 2016; Ngwa et al., 2017), όμως οι παραδόσεις τους εμπλέκουν πολλαπλές παραμέτρους σε διαφορετικά στάδια (CPPs, Cas9, sgRNA και για κάθε κυτταρικό τύπο). Το γεγονός αυτό προσδίδει στη στρατηγική αυτή μεταβλητό χαρακτήρα και προϋποθέτει λεπτομερή βελτιστοποίηση. Συνεπώς, δεν αποτελεί ιδανική μέθοδο για επιτυχή γονιδιωματική επεξεργασία *in vivo*.

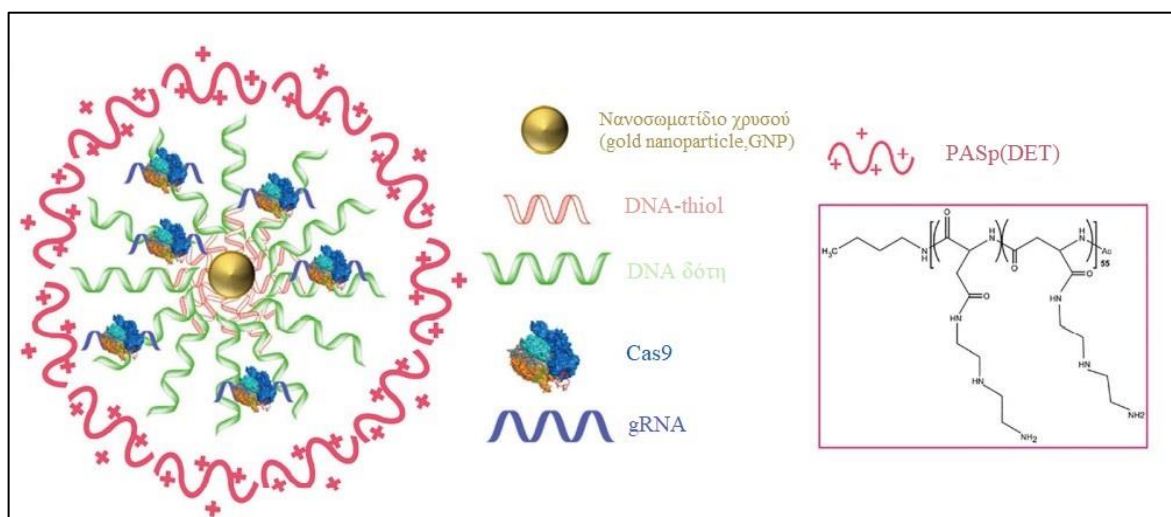
#### **2.7.3.1.2.3.3. Νανοσωματίδια χρυσού (Gold nanoparticles, AuNPs)**

Τα νανοσωματίδια χρυσού δύνανται να παραδώσουν με αποτελεσματικότητα τα σύμπλοκα Cas9 RNP για την επίτευξη γονιδιωματικής επεξεργασίας (K. Lee et al., 2018; Yip et al., 2020). Είναι αδρανή από χημικής άποψης (Yip et al., 2020; X. Zhang et al., 2015) και επομένως δεν προκαλούν ανοσολογική αντίδραση στον ξενιστή μετά την παράδοση (K. Lee et al., 2018; Yip et al., 2020), με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ασφάλεια της μεθόδου. Όπως μάλιστα αποδείχθηκε, φορείς που βασίζονται στα νανοσωματίδια χρυσού (CRISPR-Gold) μπορούν να παραδώσουν το RNP και το DNA-δότη για την επιδιόρθωση γονιδιακών μεταλλάξεων μέσω του μονοπατιού HDR (K. Lee et al., 2018).

Για την παραγωγή των νανοσωματιδίων CRISPR-Gold ουσιαστικά συνδυάζεται ένας σκελετός χρυσού μαζί με ολιγονουκλεοτίδια τροποποιημένα με θειόλη (DNA-Thiol), και μετά ακολουθεί η υβριδοποίηση του DNA-δότη. Στη συνέχεια προσδένονται τα RNPs ενώ η πιο απομακρυσμένη στιβάδα του νανοσωματιδίου καλύπτεται από το κατιονικό πολυμερές πολύ (N-(N-(2-αμινοαιθύλιο)-2-αμινοαιθύλιο) ασπαρταμίδη [PAsp (DET)] (**Εικόνα 11**). Η παρουσία του εξωτερικού αυτού στρώματος διευκολύνει την κυτταρική πρόσληψη και τη διακοπή της ενδοσωμικής μεμβράνης, ώστε να προαχθεί η ενδοκυτταρική παράδοση των συστατικών στοιχείων του συστήματος CRISPR/Cas9. Η

διευκόλυνση αυτή είναι αποτέλεσμα της κατιονικής φύσης του PAsp (DET) και της ‘proton sponge’<sup>8</sup> δράσης του (K. Lee et al., 2018; X. Xu et al., 2019).

Η μέθοδος CRISPR-Gold φάνηκε ότι επάγει τον ανασυνδυασμό τύπου HDR σε κυτταρικές σειρές και «πρωταρχικά» κύτταρα με αποτελεσματικότητα περίπου 4%. Έτσι, αποδεικνύεται ως πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με τη διαμόλυνση ή την πυρηνική μόλυνση με χρήση λιποφεκταμίνης για την επαγωγή HDR *in vitro*. Επιπλέον, η ενδοκυτταρική χορήγηση CRISPR-Gold σε ποντίκια προήγαγε τον ανασυνδυασμό τύπου HDR επιδιορθώνοντας σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο της δυστροφίνης *in vivo* με αποτελεσματικότητα περίπου 5% (Yip et al., 2020). Είναι γεγονός πως απαιτείται περαιτέρω έρευνα ώστε να βελτιωθεί η ικανότητα επεξεργασίας της τεχνικής αυτής, όμως δεν παύει να αποτελεί μια ασφαλέστερη εναλλακτική για γονιδιοματική επεξεργασία μεσολαβούμενη από HDR σε σχέση με τις προαναφερόμενες ικές προσεγγίσεις.



Εικόνα 11 Σχηματική αναπαράσταση της τυπικής σύνθεσης ενός νανοδοματιδίου χρυσού [Προσαρμογή από ((X. Xu et al., 2019)].

<sup>8</sup> Τα κατιονικά πολυμερή όπως η πολυαιθυλενιμίνη (PEI) χρησιμοποιούνται σε πολλούς καινοτόμους σχεδιασμούς μη ικόν φορέων και έτσι η ανάγκη για κατανόηση του μηχανισμού αλληλεπίδρασής τους με τα κύτταρα είναι επιτακτική. Στο πλαίσιο αυτό, η υπόθεση ‘proton sponge’ παραμένει ο επικρατέστερος μηχανισμός δράσης. Η υπόθεση αυτή σχετίζεται με την υψηλή ρυθμιστική ικανότητα της PEI η οποία φαίνεται πως αυξάνει το λυσοσωμικό pH χωρίς ωστόσο να υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία περί αυτού (Benjaminson et al., 2013).

#### 2.7.3.1.2.3.4. Εξωκυτταρικά κυστίδια

Πέρα από τις προαναφερόμενες στρατηγικές, διάφορες μελέτες κάνουν λόγο για την αποτελεσματική παράδοση των Cas9 ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων *in vitro* και *in vivo* μέσω εξωκυτταρικών κυστιδίων (Campbell et al., 2019; Choi et al., 2016; Gee et al., 2020; Mangeot et al., 2019; Montagna et al., 2018; Yip et al., 2020).

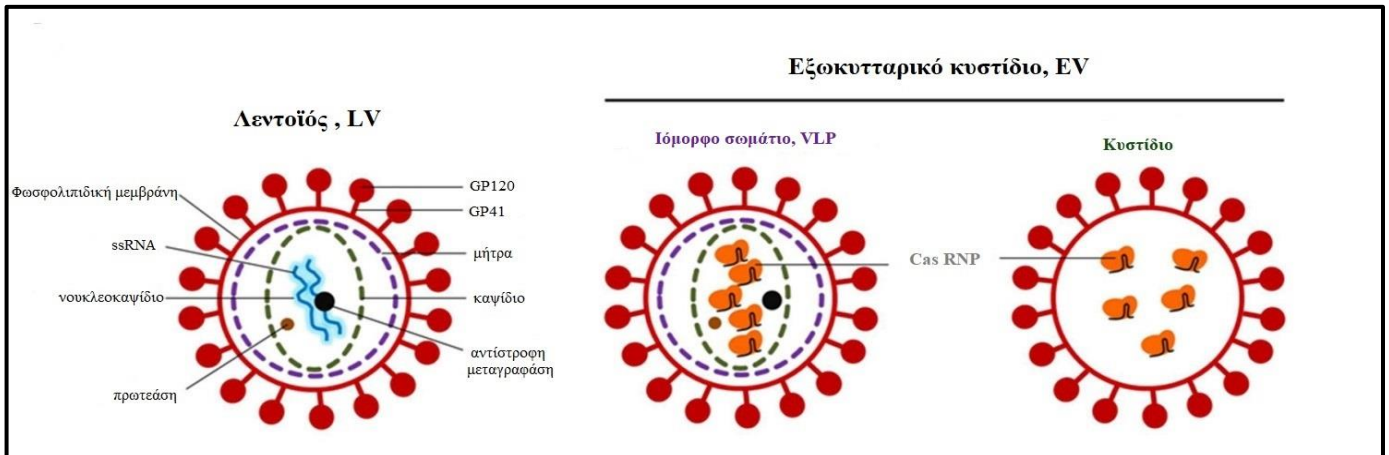
Ο σχηματισμός των εξωκυτταρικών κυστιδίων βασίζεται στην έκφραση και την αυτο-συναρμολόγηση του ιικού φακέλου και/ή των ιικών δομικών πρωτεϊνών (Philippe Emmanuel Mangeot et al., 2011; Montagna et al., 2018; Briggs et al., 2004; Yip et al., 2020). Ο όρος ιόμορφα σωματίδια (Virus-Like Particles, VLPs) αποκτά υπόσταση όταν και ο ιικός φάκελος και οι ιικές δομικές πρωτεΐνες συναρμολογούνται από κοινού μέσα στα κυστίδια. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος συντήκεται με την πολυπρωτεΐνη Gag ώστε να μπορέσουν να ενσωματωθούν ταυτόχρονα σε ένα σωματίο. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ιικής ωρίμανσης, η έκφραση της πρωτεάσης της Pol είναι αυτή που μεσολαβεί για να συμβεί «θραύση» της πολυπρωτεΐνης Gag. Έτσι διαχωρίζεται από την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, η οποία και απελευθερώνεται (Bell & Lever et al., 2013; Yip et al., 2020).

Σε αντίθεση με τον όρο VLPs, ο όρος κυστίδια συνηθίζεται να χρησιμοποιείται όταν μόνο οι πρωτεΐνες του ιικού φακέλου συναρμολογούνται μέσα σε ένα σωματίο. Άρα τα κυστίδια περιέχουν είτε καθόλου είτε ελάχιστες ικές δομικές πρωτεΐνες. Ο σχηματισμός τους δεν εξαρτάται από την πολυπρωτεΐνη Gag και τη διάσπαση που προκαλεί η πρωτεάση. Δημιουργούνται από την εκβλάστηση της κυτταρικής μεμβράνης όταν οι πρωτεΐνες του φακέλου υπερεκφράζονται (Philippe Emmanuel Mangeot et al., 2011; Montagna et al., 2018; Yip et al., 2020). Ακολούθως απεικονίζεται η δομή των VLPs και των κυστιδίων, αντίστοιχα, σε σύγκριση με αυτή ενός λεντοϊού (**Εικόνα 12**).

Προκειμένου να επιτευχθεί παροδική έκθεση της Cas9 στα κύτταρα, το γονίδιο *Cas9* συγχωνεύθηκε μέσα σε έναν μη ιικό φορέα έκφρασης Gag/Pol. Τα VLPs παρήχθησαν μέσω συν-διαμόλυνσης του άγριου τύπου Gag/Pol και των VSV-G πλασμιδίων. Η περιοχή που κόβει η πρωτεάση (ανάμεσα στην Cas9 και την πολυπρωτεΐνη Gag) στο πλασμίδιο σύντηξης, επέτρεψε την απελευθέρωση της Cas9 κατά τη διάρκεια της ιικής ωρίμανσης. Είναι αξιοσημείωτο πως τα προ-φορτωμένα με την πρωτεΐνη Cas9 VLPs μείωσαν την επεξεργασία εκτός της περιοχής-στόχου και η παροδική έκθεση της Cas9 που προσέφεραν κρίθηκε ως χαρακτηριστικό το οποίο κάνει τα VLPs να



πλεονεκτούν σε σχέση με άλλες μεθόδους. Η μελέτη αυτή ήταν η πρώτη που ανέδειξε το πακετάρισμα της Cas9 μέσα σε VLPs για γονιδιωματική επεξεργασία (Choi et al., 2016; Yip et al., 2020).



**Εικόνα 12** Δομικές διαφορές μεταξύ ενός λεντοϊού και των δύο τύπων εξωκυτταρικών κυστιδίων (VLPs και κυστίδια) [Προσαρμογή από (Yip et al., 2020)].

Σε νεότερες μελέτες αναπτύχθηκε μια προσέγγιση, σύμφωνα με την οποία πραγματοποιούνταν προ-φόρτωση των sgRNAs στην Cas9 για το σχηματισμό συμπλόκων RNP πριν την παράδοση. Αυτό κατέστη εφικτό με τη χρήση VLPs προφορτωμένων με sgRNAs και Cas9, τις λεγόμενες «νανολεπίδες» ('nanoblades'). Οι «νανολεπίδες» παρήχθησαν μέσω της συν-διαμόλυνσης του πλασμιδίου που περιέχει το γονίδιο της πρωτεΐνης Gag του ιού λευχαιμίας των ποντικών (murine leukemia virus, MLV) συντηγμένο με το γονίδιο της πρωτεΐνης Cas9 με τα ακόλουθα τέσσερα συστατικά: τον άγριο τύπο του συμπλόκου Gag-Pol, το sgRNA, την VSV-G και πλασμίδια φακέλου μπαμπούνιων. Έτσι, καθίσταται δυνατή η φόρτωση των VLPs με πρότυπες αλληλουχίες δοτών με στόχο την επαγωγή HDR. Επιπλέον, η δυνατότητα φόρτωσης διαφορετικών sgRNAs σε κάθε σωματίο τύπου «νανολεπίδας» ανάγει τη γονιδιωματική επεξεργασία πλέον σε μια ευέλικτη διαδικασία. Η γονιδιωματική επεξεργασία που βασίζεται στις «νανολεπίδες» βρήκε εφαρμογή *in vitro* σε πρωτογενή κύτταρα και σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, ανοίγοντας το δρόμο για τη χρήση της μεσολαβούμενης μέσω VLP γονιδιωματικής επεξεργασίας *in vitro* και *in vivo* (Yip et al, 2020).

Σε άλλες μελέτες επίσης αποδείχθηκε η παραγωγή κυστιδίων προ-φορτωμένων με Cas-RNPs για την επίτευξη γονιδιωματικής επεξεργασίας. Τα αποτελέσματα αυτών αποτέλεσαν τρανή απόδειξη για τη δυνατότητα εφαρμογής των κυστιδίων στην *in vivo* θεραπεία και για τα χαρακτηριστικά υψηλής ασφάλειας που διαθέτουν, καθώς δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα και παρέχουν παροδική έκθεση της Cas9 στα κύτταρα (Campbell et al., 2019; Gee et al., 2020; Montagna et al., 2018; Yip et al., 2020).

Οι περιορισμοί οι οποίοι απαντώνται στο σύστημα που βασίζεται στα VLPs ξεπερνιούνται με τη χρήση κυστιδίων. Δεν απαιτείται πέψη από την πρωτεάση και επομένως δεν υπάρχει κίνδυνος αποικοδόμησης της πρωτεΐνης από την ίδια την πρωτεάση. Η αποικοδόμηση συμβαίνει σε περίπτωση που η πρωτεάση δράσει στις κρυφές<sup>9</sup> θέσεις που υπάρχουν στην πρωτεΐνη Cas9. Επιπλέον, ο ανταγωνισμός μεταξύ του άγριου τύπου Gag και των Gag-Cas9 πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του πακεταρίσματος δεν αποτελεί πρόβλημα. Βέβαια δεν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν την επιτυχή ενσωμάτωση πρότυπων αλληλουχιών-δοτών μέσα στα κυστίδια για τη προαγωγή της γονιδιωματικής επεξεργασίας μέσω HDR. Παρά την προοπτική που φαίνεται να έχουν στο μέλλον, απαιτείται περαιτέρω έρευνα ούτως ώστε να αναπτυχθούν ολοκληρωμένα κυστίδια για εφαρμογή τους στη γονιδιωματική επεξεργασία (Yip et al., 2020).

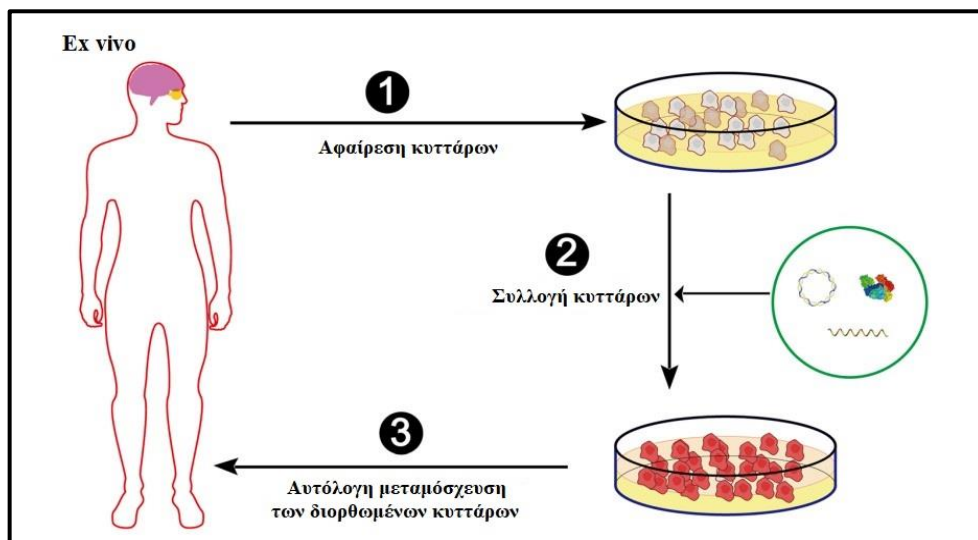
Συμπερασματικά, τα θετικά στοιχεία των εξωκυτταρικών κυστιδίων είναι πως, σε αντίθεση με τους λεντοϊούς για παράδειγμα, δεν περιέχουν κανένα ιικό γονιδίωμα. Συνεπώς δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του ξενιστή και δεν πολλαπλασιάζονται (Fuenmayor et al., 2020; Yip et al., 2020). Αυτό το χαρακτηριστικό τα καθιστά μια ιδιαίτερα ασφαλή εκδοχή ικής μεταφοράς. Επιπλέον, ο χρόνος έκθεσης της Cas9 στα κύτταρα είναι παροδικός, και έτσι μειώνεται η πιθανότητα για επεξεργασία εκτός της περιοχής-στόχου, η οποία είναι ιδιαίτερος αυξημένη σε περίπτωση μακροπρόθεσμης έκφρασης της Cas9 (Wu et al., 2014; Yip et al., 2020). Παράλληλα, παράγονται με εύκολο τρόπο και αποτελούν μια οικονομικά αποδοτική λύση, καθώς απαιτείται μόνο η τυπική διαμόλυνση πλασμιδίων μέσα σε πακεταρισμένα κύτταρα (Fuenmayor et al., 2020; Yip et al., 2020).

---

<sup>9</sup> Οι κρυφές θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών έχει αποδειχθεί πως παρουσιάζουν φαρμακευτικά οφέλη και δίνουν τη δυνατότητα στόχευσης απαιτητικών πρωτεϊνών. Δεν είναι ορατές σε πρωτεΐνες-στόχους που έχουν κρυσταλλωθεί χωρίς τη δημιουργία συμπλόκου. Γίνονται ορατές μόνο μέσω κρυσταλλογραφίας αφού λάβουν χώρα γεγονότα πρόσδεσης (Gervasio et al., 2021).

## 2.7.4. *In vivo* παράδοση έναντι *ex vivo* παράδοσης

Στα πλαίσια εφαρμογής της θεραπευτικής γονιδιωματικής επεξεργασίας *in vivo*, υπάρχουν δύο μονοπάτια για την παράδοση του συστήματος CRISPR/Cas9. Το πρώτο είναι η *in vivo* παράδοση, κατά την οποία τα συστατικά στοιχεία της γονιδιωματικής επεξεργασίας εγχύονται απευθείας μέσα στον οργανισμό ενδιαφέροντος. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιούνται συγκεκριμένες οδοί χορήγησης για την απευθείας διαμόλυνση τέτοιων συστατικών. Η δεύτερη επιλογή είναι η *ex vivo* παράδοση, κατά την οποία τα κύτταρα απομονώνονται πρώτα από το ζώο ή το ανθρώπινο σώμα, και έπειτα ακολουθείται *in vitro* διαμόλυνση και επαναχορήγηση των επεξεργασμένων κυττάρων μέσα στον οργανισμό. Μέχρι σήμερα, τόσο οι ιικοί όσο και οι μη ιικοί φορείς που αναλύθηκαν προηγουμένως υιοθετούνται για τη θεραπευτική εφαρμογή της γονιδιωματικής επεξεργασίας.



**Εικόνα 13** Σχηματική απεικόνιση της *ex vivo* παράδοσης. Με 1,2,3 σημειώνονται στην εικόνα οι παράγοντες που επιδρούν στην αποτελεσματικότητα της γονιδιωματικής *ex vivo* (απομόνωση, διαμόλυνση και μεταμόσχευση, αντίστοιχα). Τα επεξεργασμένα κύτταρα φαίνονται με κόκκινο χρώμα, ενώ τα μη επεξεργασμένα με ροζ [Προσαρμογή από (Xu et al., 2019)].

Αναφερόμενοι στα θετικά και αρνητικά της *in vivo* και *ex vivo* παράδοσης είναι σημαντικό να επισημάνουμε πως για τον πρώτο τρόπο, η άμεση *in vivo* χορήγηση είναι σαφής διαδικασία και διενεργείται με ευκολία. Όμως, διάφορα εξωκυτταρικά εμπόδια φαίνεται πως περιορίζουν την αποτελεσματικότητα της γονιδιωματικής που προσφέρει το CRISPR/Cas9 σύστημα ζημιώνοντας τη δράση ενδονουκλεάσης της Cas9. Από την άλλη,

η παράδοση *ex vivo* αποτελεί μια πιο αποτελεσματική προσέγγιση. Αυτό οφείλεται στο ότι επεξεργάζονται αυτόλογα κύτταρα έξω από τον οργανισμό ενδιαφέροντος, στο δοκιμαστικό σωλήνα (*in vitro*). Οι διαδικασίες βέβαια που απαιτούνται δηλαδή η απομόνωση των κυττάρων, η καλλιέργειά τους και, στη συνέχεια, η μεταμόσχευσή τους περιορίζουν σημαντικά το εύρος εφαρμογής της μεθόδου (X. Xu et al., 2019) (**Εικόνα 13**).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **3.1. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CRISPR/Cas9 ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΝΟΣΩΝ**

#### **3.1.1. Η θεραπευτική χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 ενάντια στον ιό ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV)**

##### **3.1.1.1. Η μάστιγα του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας**

Ο ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV), που είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS), παραμένει μέχρι και σήμερα ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας παγκοσμίως. Σύμφωνα με τα στατιστικά του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO), μέχρι το τέλος του 2017 ο HIV-1 ιός επηρέαζε περίπου 36.9 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως, με περίπου 1.8 εκατομμύρια νέες λοιμώξεις ανά έτος (Noy & Gulick et al., 2018; Xiao et al., 2019) και έχοντας επιφέρει περίπου 900.000 θανάτους σε όλο τον κόσμο. Ο φορέας του ιού μπορεί να αναπτύξει σοβαρή ανοσοανεπάρκεια αφού τα κύρια κύτταρα στα οποία επιτίθεται ο ιός είναι τα CD4+ T λεμφοκύτταρα, με αποτέλεσμα το AIDS. Οι σοβαρότερες επιπλοκές που προκαλούνται από τη λοίμωξη HIV οφείλονται σε άλλες ευκαιριακές λοιμώξεις, οι οποίες εμφανίζονται με αυξημένη συχνότητα και ένταση λόγω της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (Sanches-Da-Silva et al., 2019).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως, σύμφωνα με τα στατιστικά, από το σύνολο των ασθενών με HIV μόλις το 59% λαμβάνει εξαιρετικά ενεργή αντιρετροϊκή θεραπεία (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART). Η HAART αποτελεί μέχρι σήμερα την κύρια θεραπευτική στρατηγική για τους ασθενείς με HIV-1 και φαίνεται πως έχει καταφέρει να μειώσει τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα των ασθενειών που συνδέονται με τον HIV (Noy & Gulick et al., 2018; Xiao et al., 2019). Παρόλα αυτά, η αγωγή αυτή δεν εξαλείφει αποτελεσματικά τις δεξαμενές του ιού που βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση. Οι δεξαμενές αυτές περιλαμβάνουν τα μακροφάγα, τα μικρογλοιακά κύτταρα, τα αστροκύτταρα, τα λεμφοειδή κύτταρα του εντέρου και κυρίως τα CD4+ κύτταρα μνήμης (Maartens et al., 2014; Wainberg et al., 2011; Desai et al., 2012; Sanches-Da-Silva et al., 2019). Γι' αυτό και το AIDS παραμένει μια ανίατη ασθένεια (Xiao et al., 2019). Επιπλέον το κόστος της HAART είναι αυξημένο, η χρήση της συνδέεται με παρενέργειες, ενώ παρατηρείται και ανάπτυξη αντοχής στην αντιρετροϊκή

θεραπεία (Xiao et al., 2019; Larder et al., 1989). Αυτοί είναι μερικοί από τους λόγους που καθιστούν την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για την εξάλειψη των λανθανουσών δεξαμενών και την παρεμπόδιση πολλαπλασιασμού του HIV-1 επιτακτική ανάγκη.

Η πρώτη εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9 με στόχο την παρεμπόδιση της HIV-1 λοίμωξης καταγράφηκε το 2013 μέσω διακοπής του λανθάνοντα HIV-1 προϊόντος (Ebina et al., 2013; Xiao et al., 2019). Στη συνέχεια, διεξήχθησαν πολλές άλλες μελέτες που χρησιμοποίησαν την τεχνολογία CRISPR/Cas9 για τη γονιδιακή θεραπεία του HIV/AIDS. Αυτές υπέδειξαν την τεράστια προοπτική του συστήματος αυτού για τη θεραπεία μιας τόσο πολυσυζητημένης και στιγματισμένης ασθένειας (Shuliang Chen et al., 2018).

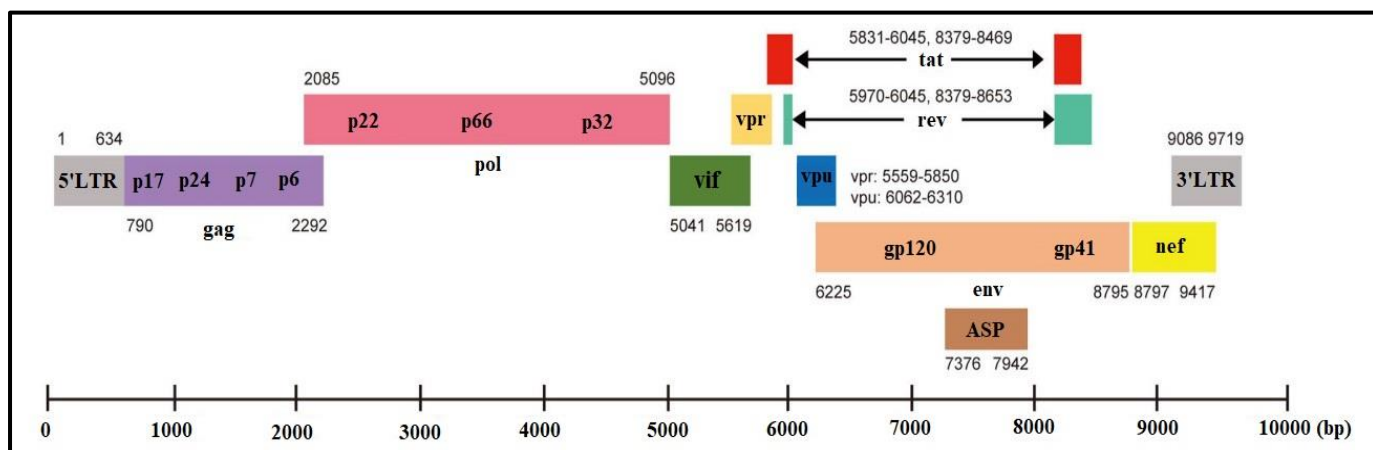
### **3.1.1.2. Βασικά χαρακτηριστικά του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας**

Ο ιός HIV διακρίνεται σε δύο διαφορετικούς τύπους: τον HIV-1 και τον HIV-2. Και οι δύο τύποι μπορούν να οδηγήσουν στο σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας, ενώ παρουσιάζουν ομοιότητες μεταξύ τους (Nyamweya et al., 2013; Xiao et al., 2019). Συγκρίνοντας τους δύο τύπους του ιού HIV, προκύπτει ότι ο HIV-2 παρουσιάζει χαμηλότερη μεταδοτικότητα και είναι λιγότερο παθογόνος. Ο HIV-1 επομένως ορίζεται ως η κύρια αιτία του AIDS και αποτελεί τον κύριο στόχο για την πρόληψη και τη θεραπεία του.

Ο HIV-1 είναι ένας ρετροϊός της ομάδας των λεντοϊών που έχει φάκελο και σχηματίζεται από δύο μονόκλωνα μόρια RNA, τα οποία περιβάλλονται από καψίδιο. Όσον αφορά το γονιδίωμα του ιού, αυτό αποτελείται από εννιά αλληλεπικαλυπτόμενα γονίδια τα οποία καλούνται *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* και *vpr*, ενώ στο κάθε άκρο του υπάρχει μία μακριά τερματική επανάληψη (Long Terminal Repeat, LTR) (Sanches-Da-Silva et al., 2019). Το ικό γονιδίωμα, εκτός από τα προαναφερόμενα γονίδια, κωδικοποιεί και την antisense πρωτεΐνη (ASP) (**Εικόνα 14**). Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν διαφορετικές λειτουργίες σχετικές με την αντιγραφή και την εισβολή του ιού.

Οι κύριες οδοί μετάδοσης του ιού είναι η σεξουαλική επαφή χωρίς προφυλάξεις, η επαφή με μολυσμένο αίμα, η κοινή χρήση μολυσμένων συρίγγων και βελόνων και η κάθετη μετάδοση (από τη μητέρα στο παιδί) (Rumbwere Dube et al., 2016; Sanches-Da-

Silva et al., 2019; Shaw & Hunter et al., 2012). Μεγάλος αριθμός ανθρώπων που έχει προσβληθεί από τον ιό εμφανίζει πρώιμα συμπτώματα (περίπου 2-6 εβδομάδες μετά τη μόλυνση) που μοιάζουν με αυτά της γρίπης. Η κατάσταση αυτή αποκαλείται σύνδρομο ρετροϊού και τις περισσότερες φορές επειδή τα συμπτώματα υποχωρούν περνάει απαρατήρητο (Sanches-Da-Silva et al., 2019). Όλοι οι ασθενείς με HIV-1 λοίμωξη εμφανίζουν τρία στάδια λοίμωξης: 1) την οξεία λοίμωξη HIV, 2) τη χρόνια λοίμωξη HIV (λανθάνουσα φάση) και 3) την κλινική ασθένεια (AIDS) (Sharp & Hahn et al., 2011; Xiao et al., 2019).



**Εικόνα 14 Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γονιδιώματος του ιού HIV-1.** Όπως φαίνεται, έχει μήκος περίπου 9,8 kb, περιλαμβάνει τις περιοχές 5'-LTR, 3'-LTR, και τις κωδικοποιητικές περιοχές για 10 ιικές πρωτεΐνες. Το κάθε γονίδιο φαίνεται στην ειδική του θέση [Προσαρμογή από (Xiao et al., 2019)].

### 3.1.1.3. Κύκλος μόλυνσης που ακολουθεί ο ιός HIV-1

Με την είσοδό του στον ξενιστή, ο HIV-1 διαπερνά το φράγμα του βλεννογόνου και προσδένεται με τη βοήθεια της γλυκοπρωτεΐνης του φακέλου του gp120 στους υποδοχείς CD4+ που είναι παρόντες στα μακροφάγα, στα δενδριτικά κύτταρα και στα CD4+ T λεμφοκύτταρα. Η πρόσδεση αυτή προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές στη γλυκοπρωτεΐνη, διευκολύνοντας την πρόσδεση στους συν-υποδοχείς χημειοκινών CCR5 ή CXCR4. Ο συν-υποδοχέας CCR5 εκφράζεται στα CD4+ T λεμφοκύτταρα, ενώ ο CXCR4 σε όλα τα υπόλοιπα. Στη συνέχεια, και μετά από αυτή τη συσχέτιση, η ιική γλυκοπρωτεΐνη gp41 συντήκεται με την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-στόχου. Συμβαίνει ενσωμάτωση των ιικών και κυτταρικών μεμβρανών, και εν τέλει απελευθέρωση του καπιδίου μέσα στο κυτταρόπλασμα. Αμέσως μετά, οι πρωτεάσες θα επιδράσουν στο



καψίδιο και έτσι το ικό RNA θα απελευθερωθεί (Sanches-Da-Silva et al., 2019; Wager et al., 2011). Στο κυτταρόπλασμα, η αντίστροφη μεταγραφάση του ιού χρησιμοποιεί το μονόκλωνο ικό RNA σαν καλούπι από το οποίο θα προκύψει δίκλωνο ικό DNA. Με τη βοήθεια της ικής ιντεγκράσης θα ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα του ξενιστή. Το ενσωματωμένο πλέον γονιδίωμα του ιού μεταγράφεται και μεταφράζεται. Στη συνέχεια συναρμολογούνται νέοι ιοί αφού έχουν παραχθεί ικές πρωτεΐνες και έχει αντιγραφεί το γενετικό υλικό. Αυτοί θα περιλαμβάνουν και μέρος της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή, προκειμένου να σχηματιστεί ο φάκελος με μια διαδικασία γνωστή ως εκβλάστηση ή ‘budding off’. Με αυτό τον τρόπο απελευθερώνονται ώριμα και μολυσματικά ιικά σωματίδια (Sanches-Da-Silva et al., 2019).

#### **3.1.1.4. Λανθάνουσα και ενεργή λοίμωξη**

Η είσοδος του HIV-1 στα κύτταρα εγκαθιδρύει δύο τύπους λοιμώξεων: τη λανθάνουσα λοίμωξη και την ενεργή λοίμωξη. Η πρώτη συμβαίνει στα αρχικά στάδια της μόλυνσης μέσα σε λίγα κύτταρα, ενώ η δεύτερη συναντάται στην πλειοψηφία των κυττάρων (Chavez et al., 2015; Xiao et al., 2019).

Στην περίπτωση της ενεργής λοίμωξης, ο προϊός είναι ενεργός και παράγει ιικά σωματίδια, τα οποία ωθούν τα μολυσμένα κύτταρα να εξάγουν στο εξωκυττάριο περιβάλλον νέα ιικά σωματίδια-απογόνους. Η εγκατάσταση της λανθάνουσας λοίμωξης διαμεσολαβείται μέσω περίπλοκων μηχανισμών, όπως είναι η RNA παρεμβολή (Huang et al., 2007; Patel et al., 2014; Xiao et al., 2019), αλλά και από το περιβάλλον της χρωματίνης (du Chene et al., 2007; Gallastegui et al., 2011; Xiao et al., 2019), τους μεταγραφικούς παράγοντες (Barboric et al., 2001; Wager et al., 2011; Xiao et al., 2019) και τις περιοχές ενσωμάτωσης του προϊού HIV-1 (du Chene et al., 2007; Sunshine et al., 2016; Xiao et al., 2019).

Η λανθάνουσα λοίμωξη ευθύνεται για την παραγωγή των λανθανουσών δεξαμενών του ιού που προαναφέρθηκαν. Οι δεξαμενές αυτές εντοπίζονται συνήθως σε περιοχές όπως ο γαστρεντερικός σωλήνας (Smith et al., 2003; Xiao et al., 2019), ο εγκέφαλος (Xiao et al., 2019; Bagasra et al., 1996; Fisher-Smith et al., 2001) και οι λεμφοειδείς ιστοί (Xiao et al., 2019), που είναι σημεία δύσκολα προσβάσιμα από τα αντιικά φάρμακα. Τα κύτταρα που «φιλοξενούν» τη λανθάνουσα λοίμωξη επανενεργοποιούνται μέσω κάποιου ερεθίσματος, και εν συνεχεία παράγεται νεο-συντιθέμενος ιός, ο οποίος μολύνει γειτονικά κύτταρα. Μετά μία νέα λανθάνουσα δεξαμενή θα επαναεγκατασταθεί. Επιβεβαιώνεται έτσι για ποιο

λόγο οι λανθάνουσες δεξαμενές του HIV-1 αποτελούν τη μεγαλύτερη πρόκληση για την αποτελεσματική θεραπεία του HIV/AIDS (Xiao et al., 2019).

### 3.1.1.5. Το γονίδιο του φακέλου του HIV και οι συν-υποδοχείς

Το γονίδιο του φακέλου του HIV κωδικοποιεί την ιική γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου gp160, που αποτελεί πρόδρομο των γλυκοπρωτεϊνών gp41 και gp120. Η γλυκοπρωτεΐνη gp120 είναι κυρίως υπεύθυνη για την πρόσδεση στο υποδοχέα του κυττάρου-ξενιστή με σκοπό να καθορίσει τον τροπισμό του, ενώ επεκτείνεται πέρα από την λιπιδική μεμβράνη του ιού. Επίσης, εμφανίζει πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης για διάφορες προσαρμοστικές αντιδράσεις ανοσίας. Έχει ταξινομηθεί ευρύτερα σε πέντε υπερ-μεταβλητές περιοχές (V1-V5), συντηρημένες και διάσπαρτες (O'Brien & Moore et al., 2000; Sanches-Da-Silva et al., 2019; Williamson et al., 2003). Καθώς για την εισβολή του ιού HIV-1 στο κύτταρο ξενιστή προαπαιτείται η ιική πρόσδεση στο μόριο CD4 μαζί με τους συν-υποδοχείς CCR5 και CXCR4, ο τροπισμός του HIV επομένως οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στα μοτίβα έκφρασης των δύο αυτών συν-υποδοχέων (Doms et al., 2001; Sanches-Da-Silva et al., 2019).

Ανάλογα με τον υποδοχέα που χρησιμοποιούν, τα στελέχη του HIV κατατάσσονται σε στελέχη με τροπισμό CCR5, τροπισμό CXCR4 και διπλό τροπισμό (CCR5/CXCR4). Τα στελέχη με τροπισμό CCR5 είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται σε μακροφάγα (τροπισμός M) και πρωτογενή T κύτταρα, και είναι υπεύθυνα για το 90% των πρωτογενών λοιμώξεων. Είναι ο πιο κοινός τύπος ιού που απομονώνεται από ασυμπτωματικά άτομα, και ο πλέον μεταδός μεταξύ των ανθρώπων. Τα στελέχη με τροπισμό CXCR4 πολλαπλασιάζονται σε T λεμφοκύτταρα (τροπισμός T), και μπορούν να εξελιχθούν κατά τη διάρκεια της ασθένειας εξαιτίας μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη του φακέλου (Doms et al., 2001; O'Brien & Moore et al., 2000; Rose et al., 2009; Sanches-Da-Silva et al., 2019).

Ορισμένοι άνθρωποι παρουσιάζουν υψηλή ανοχή στη λοίμωξη HIV χωρίς όμως να έχουν αναπτύξει πλήρη ανοσία. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε μία απαλοιφή μήκους 32 ζευγών βάσεων στο CCR5 γονίδιο (CCR5Δ32). Προκύπτει έτσι μετατόπιση πλαισίου και δημιουργία πρωτεΐνης, η οποία δε φτάνει την κυτταρική επιφάνεια. Η ανακάλυψη αυτή επιβεβαιώνει τη σπουδαιότητα του συν-υποδοχέα αυτού, καθώς έχει παρατηρηθεί πως τα επίπεδά του συνδέονται με το βαθμό της μόλυνσης. Επομένως, ακόμη και άτομα ετερόζυγα ως προς τη μετάλλαξη αυτή εμφανίζουν πλεονέκτημα επιβίωσης σε σύγκριση

με τα άτομα που δε φέρουν τη μετάλλαξη. Εκφράζουν λιγότερους υποδοχείς CCR5 στα κύτταρα, γεγονός που καθυστερεί την αντιγραφή του HIV, και άρα επαγωγικά, και το θάνατο των CD4+ CCR5+ T λεμφοκυττάρων (Doms et al., 2001; O'Brien & Moore et al., 2000; Sanches-Da-Silva et al., 2019).

### **3.1.1.6 Θεραπευτικές anti-HIV στρατηγικές που βασίζονται στο σύστημα CRISPR/Cas9**

Το σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να τροποποιήσει τα κύτταρα-ξενιστές με τρόπο που να τα καθιστά πλέον μη ευάλωτα στη λοίμωξη HIV. Την τελευταία δεκαετία, πολλαπλές μελέτες επικεντρώθηκαν στην απενεργοποίηση των υποδοχέων CCR5 ή CXCR4 (Allers & Schneider et al., 2015; Das et al., 2019), καθώς ο HIV-1 εισέρχεται στα κύτταρα μετά την πρόσδεση της ιικής πρωτεΐνης του φακέλου CD4 σε έναν από τους δύο αυτούς συν-υποδοχείς. Η προσέγγιση αυτή προέκυψε ύστερα από την επιτυχή θεραπεία του «ασθενή του Βερολίνου» όπως ονομάστηκε. Ο μολυσμένος με HIV-1 ασθενής υποβλήθηκε σε μεταμόσχευση αλλογενών βλαστικών κυττάρων, επιτυγχάνοντας έτσι πλήρη αντικατάσταση των βλαστικών του κυττάρων με CCR5Δ32/Δ32 CD34+ περιφερικά βλαστικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την καταστολή του ικού πολλαπλασιασμού (Ganepola et al., 2009).

Εξαιτίας όμως της σπανιότητας δοτών ομόζυγων για το CCR5Δ32, κατάλληλων για μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων, έχει επιστρατευθεί το σύστημα CRISPR/Cas9 προκειμένου να μειορρυθμιστεί ή να κατασταλεί πλήρως η έκφραση του CCR5 (Allers & Schneider et al., 2015; Hütter et al., 2015; Saayman et al., 2015). Παρόλα αυτά, η απενεργοποίηση του συν-υποδοχέα CCR5 ενδέχεται να πυροδοτήσει μεταλλάξεις του φακέλου, οι οποίες θα μετατοπίσουν τον υποδοχέα που χρησιμοποιεί ο ιός από CCR5 σε CXCR4 (Fätkenheuer et al., 2008; G. Wang et al., 2018). Με παρόμοιες μεθόδους, μπορεί να στοχευθεί ο CXCR4 (Das et al., 2019; Hou et al., 2015), ή και άλλοι κυτταρικοί παράγοντες που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό του ιού (Cho et al., 2016b; Das et al., 2019; Park et al., 2017), αν και κάτι τέτοιο δεν προτιμάται αφού μπορεί να έχει ανεπιθύμητες ενέργειες στη φυσιολογία του κυττάρου (Das et al., 2019). Η απενεργοποίηση επομένως των συν-υποδοχέων δεν αποτελεί στρατηγική πρώτης εκλογής για τη θεραπεία του HIV-1 αλλά μία συμπληρωματική μέθοδο.

### 3.1.1.6.1 Παρεμπόδιση της ιικής μόλυνσης

Η διαδικασία μόλυνσης από τον ιό HIV-1 είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει πολλά στάδια από την εισβολή του ιού στο κύτταρο και την αντίστροφη μεταγραφή των μορίων RNA, μέχρι την ενσωμάτωσή του στο γενετικό υλικό του κυττάρου-ξενιστή (Sanches-Da-Silva et al., 2019; Yin et al., 2018). Παρεμβαίνοντας σε ένα από τα στάδια αυτά μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 καθίσταται δυνατή η παρεμπόδιση της μόλυνσης του ξενιστή. Αναλυτικότερα, έχουν γίνει αρκετές μελέτες οι οποίες αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα του συστήματος CRISPR/Cas9 στη αναχαίτιση της μόλυνσης με τον ιό HIV-1. Μια πιθανή εναλλακτική για παρεμπόδιση του κύκλου αυτού είναι να αναπτυχθεί ανοσία που θα προφυλάσσει σταθερά από μόλυνση με το λεντοϊό, εκφράζοντας την Cas9 και το gRNA επαρκώς.

Όταν αναλύθηκε η ιική μόλυνση σε μία ανθρώπινη T κυτταρική σειρά προερχόμενη από λεμφοβλάστες για μια περίοδο 14 ημερών, δημιουργήθηκε μόριο RNA-οδηγός ικανό να στοχεύει διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος του HIV-1. Όπως δείχθηκε, υπήρξε σταθερή μείωση της ιικής έκφρασης στα κύτταρα που ενσωμάτωσαν το RNA-οδηγό που στοχεύει την αλληλουχία του HIV-1. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν όταν χρησιμοποιήθηκαν CD4+ T κύτταρα που απομονώθηκαν από πέντε διαφορετικούς δότες, καθώς επιβεβαιώθηκε η μείωση της παραγωγής του HIV-1 κατά τρεις φορές σε σχέση με τα αρχικά δείγματα ελέγχου, ενώ οι κυτταρικές αυτές σειρές φάνηκε ότι ανέπτυσαν προστασία ενάντια σε ιικές μολύνσεις παρόμοια με αυτή που αποκτάται έπειτα από παροδική μεταγωγή και παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα (Liao et al., 2015; Sanches-Da-Silva et al., 2019).

Το σύστημα CRISPR/Cas9 εφαρμόστηκε σε αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές που λειτουργούν ως δεξαμενές του ιού, όπως είναι δηλαδή τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Παρήχθησαν anti-HIV σειρές ανθρώπινων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (human Pluripotent Stem Cells, hPSCs), ενώ κύτταρα τα οποία θα διαφοροποιούνταν σε μονοκύτταρα-μακροφάγα απομονώθηκαν και μολύνθηκαν με τον ιό HIV-1 με τροπισμό M. Τα κύτταρα αυτά ανέπτυξαν αντοχή στον HIV-1 τρεις μέρες αργότερα, ενώ επιβεβαιώθηκε πως η μέθοδος αυτή δεν προκαλεί γονοτοξικότητα, καθώς τα hPSCs υπόκεινται σε διαδικασίες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης πριν την ωρίμανσή τους. Επιπλέον, ο πιο αποτελεσματικός στόχος για την περιοχή LTR (γνωστός ως LTR-T2) δεν προκάλεσε τροποποιήσεις εκτός περιοχής-στόχου εφόσον η περιοχή αυτή

εμφάνιζε ομοιότητες με τις αλληλουχίες του ανθρώπινου γονιδιώματος (Liao et al., 2015; Sanches-Da-Silva et al., 2019).

Σύμφωνα με μια άλλη στρατηγική, το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Cas9 τοποθετήθηκε υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή που ενεργοποιείται από την ιική πρωτεΐνη Tat, η οποία απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μόλυνσης. Έπειτα, τέθηκε υπό αξιολόγηση κατά πόσο η πρωτεΐνη Tat θα μπορούσε να πυροδοτήσει τη στοιχειώδη παραγωγή της ενδονουκλεάσης στο κύτταρο, εφόσον θεωρείται σημαντική για τη μεταγραφή του ιού. Έτσι, επεξεργάστηκαν κύτταρα TZM.bI με ένα φορέα έκφρασης που περιείχε ειδικές περιοχές του υποκινητή του HIV-1 και την αλληλουχία του γονιδίου Cas9. Ακολούθως εξοπλίστηκαν με πολλαπλά gRNAs A και B. Τα gRNAs αυτά στοχεύουν στην περιοχή LTR. Μετά τη μόλυνση των κυττάρων με διαφορετικές ποσότητες HIV-1, αυτό που παρατηρήθηκε ήταν πέψη του γενετικού υλικού του ιού, άρα η παραγωγή Tat κατά τη διάρκεια της μόλυνσης ενεργοποίησε τον υποκινητή ώστε να εκφραστεί η πρωτεΐνη Cas9. Με αυτό τον τρόπο λοιπόν, προωθείται η αφαίρεση του HIV-1 στο αρχικό στάδιο ή η επανενεργοποίηση του λανθάνοντα ιού (Kaminski et al., 2016; Sanches-Da-Silva et al., 2019).

Οι προαναφερόμενες μελέτες αποτελούν απόδειξη πως η χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 ως εμβολίου είναι μια αξιοσημείωτη στρατηγική, η οποία εμφανίζεται αποτελεσματική ανεξαρτήτως των στελεχών HIV-1 που συμμετέχουν στη λοίμωξη, αφού οι στόχοι είναι γονιδιωματικές αλληλουχίες του ιού και ενδεχομένως δρουν πριν την ενσωμάτωση στο γενετικό υλικό του κυττάρου-ξενιστή (Sanches-Da-Silva et al., 2019).

### **3.1.1.6.2. Παρεμπόδιση της αντιγραφής του ιού**

Σύμφωνα με τη μέθοδο παρεμπόδισης της αντιγραφής του ιού HIV-1, κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν με ένα πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο της Cas9 μαζί με ένα PAM πυρηνικού εντοπισμού, ενώ σε αυτά παρασχέθηκαν ακόμη πολλαπλά gRNAs, εκ των οποίων το ένα στοχεύει την περιοχή LTR και τα υπόλοιπα τα γονίδια *gag* και *pol*, ούτως ώστε να επιτευχθεί ο βέλτιστος συνδυασμός. Τα αποτελέσματα της μεθόδου έδειξαν υψηλή αποτελεσματικότητα για όλους τους συνδυασμούς που περιλάμβαναν gRNA για τα γονίδια *gag* και *LTR*, μειώνοντας την έκφραση της πρωτεΐνης αναφοράς λουσιφεράσης σε ποσοστό μεγαλύτερο του 96%. Από την άλλη, η χρήση RNA-οδηγού για την περιοχή LTR

μαζί με τη στόχευση οποιασδήποτε άλλης περιοχής του γονιδιώματος του HIV-1 μείωσε την πρωτεΐνη σε ποσοστό μεγαλύτερο του 23%. Προκύπτει λοιπόν πως η επιστράτευση ενός συνδυασμού gRNAs που στοχεύουν την περιοχή LTR και άλλα δομικά γονίδια του ιού αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική στρατηγική για τη στόχευση του ιού με ακρίβεια (Yin et al., 2016).

Όπως παρατηρήθηκε, τα RNA-οδηγοί που στοχεύουν την LTR και το γονίδιο *tat* οδηγούν σε σημαντικότερο ποσοστό μείωσης της έκφρασης της πρωτεΐνης αναφοράς σε σχέση με τα άλλα, υποψήφια προς στόχευση, γονίδια του ιού. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός πως η ενδονουκλεάση Cas9 δύναται να στοχεύει σε αρκετές περιοχές όπου υπάρχει το γενετικό υλικό του HIV-1. Για να παραμείνει το ένζυμο στο κυτταρόπλασμα συνίσταται η χρήση ενός ενζύμου Cas9 που έχει τροποποιηθεί και στερείται σήματος πυρηνικού εντοπισμού. Με μια τέτοια προσέγγιση, το ιικό DNA θα μπορούσε να δεσμευτεί νωρίτερα, πριν δηλαδή την ενσωμάτωσή του. Ωστόσο, η χρήση ενδονουκλεάσης που περιλαμβάνει σήμα πυρηνικού εντοπισμού θα μπορούσε να λειτουργήσει ως στόχος του γονιδιώματος του HIV-1 τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα (Sanches-Da-Silva et al., 2019; Yin et al., 2018).

Καταστολή της αντιγραφής του ιού, διαμεσολαβούμενη από το σύστημα CRISPR/Cas9, παρατηρήθηκε και σε CD4+ T κύτταρα τα οποία απομονώθηκαν από υγιείς ασθενείς. Πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες μολύνθηκαν με τον ιό HIV-1 και στη συνέχεια με τον ειδικά σχεδιασμένο ιικό φορέα (λεντοϊό) για την παράδοση της Cas9 και των RNA-οδηγών A και B που στόχευαν στην περιοχή LTR. Τα επεξεργασμένα κύτταρα παρουσίασαν μειωμένο αριθμό αντιγράφων HIV-1. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) και CD4+ T κύτταρα από τέσσερις οροθετικούς ασθενείς που λάμβαναν αντιρετροϊκή θεραπεία. Ακολουθώντας παρόμοια μέθοδο ανάλυσης με την προαναφερόμενη, τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση του ιικού cDNA κατά 81% και 91% αντίστοιχα σε δύο ασθενείς στα περιφερικά κύτταρα. Τα CD4+ T κύτταρα παρουσίασαν επίσης μείωση. Σε όλες τις περιπτώσεις, παρατηρήθηκε πτώση του αριθμού των ιικών σωματίων και της έκφρασης των πρωτεϊνών Gag και p24. Η παρουσία μονο-νουκλεοτιδικών παραλλαγών (Single-Nucleotide Variations, SNVs), καθώς και ενθέσεων και απαλοιφών κοντά στην αλληλουχία PAM των περιοχών-στόχων, ευθύνεται για τη μείωση του αριθμού των αντιγράφων (Kaminski et al., 2016; Sanches-Da-Silva et al., 2019).

Σε άλλες μελέτες επιλέχθηκαν τα κύτταρα Sup-T1, στα οποία δοκιμάστηκαν δύο ιικοί φορείς λεντοιών, που περιείχαν το γονίδιο της Cas9 και αλληλουχίες για RNA-οδηγούς σχεδιασμένους έναντι διαφορετικών στόχων επί του ιικού γονιδιώματος, όπως είναι η περιοχή LTR και διάφορα άλλα γονίδια (Sanches-Da-Silva et al., 2019; G. Wang, Zhao, Berkhout, & Das, 2016). Η πρώτη μελέτη κατέγραψε την αντιγραφή του HIV-1 μέσω της παρουσίας της πρωτεΐνης p24 στην καλλιέργεια. Συγκεκριμένα τα κύτταρα που τέθηκαν υπό επεξεργασία με την Cas9 και τα gRNAs παρουσίασαν μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης αυτής. Ειδικά όσα κύτταρα έλαβαν RNA-οδηγό που στόχευε σε συντηρημένες περιοχές του ιικού γονιδιώματος εμφάνισαν μία ενεργητική πτώση σε σχέση με όσα RNA-οδηγούς αφορούσαν λιγότερο συντηρημένες περιοχές. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να συνεισφέρει στη διαφυγή του ιού. Η δεύτερη μελέτη απέδειξε πως όταν ένα ζεύγος gRNAs είναι ισχυρό, μπορεί να ακυρώσει τελείως την ιική αντιγραφή σε αντίθεση με λιγότερο αποτελεσματικά ζεύγη gRNAs τα οποία ελέγχουν μερικώς τη διαδικασία μόλυνσης και εξέλιξης του ιού (Lebbink et al., 2017).

Ακόμη δε και σε μία σύντομη περίοδο μόλυνσης παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των μολυσμένων με HIV-1 κυττάρων αλλά και της παραγωγής μολυσματικών σωματιών ως αποτέλεσμα ενθέσεων και απαλοιφών στις περιοχές-στόχους. Κατά συνέπεια, υπήρξε μείωση στη δραστηριότητα της αντίστροφης μεταγραφάσης εξαιτίας της χαμηλής αντιγραφικής ικανότητας του ιού. Ορισμένες ενθέσεις και απαλοιφές είναι ιδιαίτερα σημαντικές, καθώς κάποιες μπορούν να αποβούν θανατηφόρες για τον ιό ενώ άλλες ενδέχεται να επάγουν ανασυνδυασμό με ευεργετικά αποτελέσματα ως προς τη μολυσματικότητα και την αντοχή του. Έτσι, όταν ο στόχος δεν είναι εφικτό να παρεμποδιστεί αποτελεσματικά, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της ιικής αντιγραφής, τότε οι αλλαγές στο γονιδιώμα του ενδεχομένως να οδηγήσουν σε προσαρμοστικές βελτιώσεις. Γι' αυτό και η χρήση πολλαπλών gRNAs για διαφορετικούς στόχους στον HIV-1 θα μπορούσε να αποτελέσει επιλογή για την αποφυγή τέτοιων γεγονότων (Z. Wang, Pan, Gendron, et al., 2016).

### **3.1.1.6.3. Παρεμπόδιση προ της ιικής ενσωμάτωσης**

Εκτός από τους παραπάνω τρόπους, σε ορισμένες μελέτες επιχειρήθηκε να «σπάσει» το γονιδίωμα του HIV-1 πριν την ενσωμάτωσή του στο DNA του ξενιστή. Αναλυτικότερα, αρχικά έγιναν *in vitro* δοκιμές ώστε να μελετηθεί κατά πόσο το γενετικό υλικό του ιού μπορούσε να κοπεί και να αποικοδομηθεί στο κυτταρόπλασμα. Στη

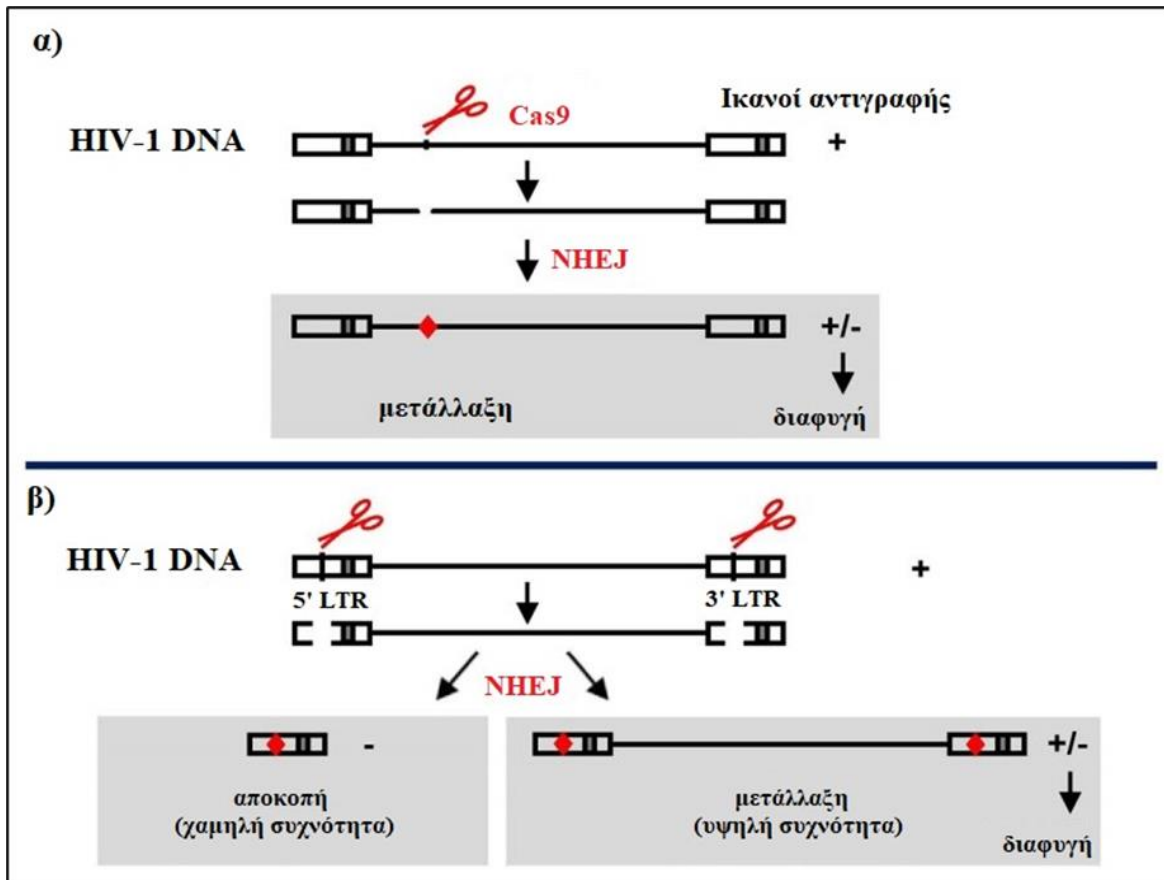
συνέχεια, αξιολογήθηκε αν όταν το νεο-συντιθέμενο συμπληρωματικό DNA του ιού (cDNA) απελευθερώνεται μέσα στο κύτταρο-ξενιστή θα μπορούσε να κοπεί από την Cas9, εμποδίζοντας τη μόλυνση από τον ιό και την ενσωμάτωσή του. Όπως δείχθηκε, χρησιμοποιώντας ως πρωτεΐνη αναφοράς την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των θετικών κυττάρων (Liao et al., 2015; Sanches-Da-Silva et al., 2019). Σε άλλη μελέτη μια άλλη ομάδα κυττάρων μολύνθηκε με τον HIV-1, ενώ είχαν υποστεί διαμόλυνση με την Cas9-NLS και με gRNAs, που είχαν ως στόχους τις περιοχές R και U5 της περιοχής LTR. Κατά την ανάλυση της ποσότητας του συντιθέμενου ιικού DNA (πρώιμου, ώριμου και ενσωματωμένου) καταγράφηκε τριπλάσια έως πενταπλάσια μείωση του ενσωματωμένου ιικού DNA, διπλάσια μείωση του ώριμου DNA (προ-ενσωματωμένο) και καμία σημαντική μείωση στην ποσότητα των πρώιμων (κυτταροπλασματικών) προϊόντων DNA. Η τελευταία παρατήρηση δικαιολογείται εξαιτίας της χρήσης πρωτεΐνης Cas9 που διαθέτει σήμα πυρηνικού εντοπισμού, συνεπώς το πρώιμο DNA παρέμεινε αμετάβλητο αφού τα πρώιμα προϊόντα αντίστροφης μεταγραφής βρίσκονταν κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Συνεπώς, το σύστημα CRISPR/Cas9 είναι ικανό να μειώσει τον αριθμό των προϊόντων λόγω αποικοδόμησης του γενετικού υλικού πριν την ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα του ξενιστή (Yin et al., 2018).

#### **3.1.1.6.4. Στόχευση κυττάρων υπό λανθάνουσα μόλυνση**

Επειδή οι δεξαμενές κυττάρων υπό λανθάνουσα μόλυνση αποτελούν το κύριο εμπόδιο στη θεραπεία του ιού HIV-1, αρκετές μελέτες επικεντρώθηκαν στο να καθορίσουν κατά πόσο το σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί να στοχεύσει και να πέψει το ενσωματωμένο DNA του προϊού στα μολυσμένα αυτά κύτταρα (G. Wang et al., 2018a) (**Εικόνα 15α**). Μέχρι σήμερα, αν και έχουν προταθεί διάφορες εναλλακτικές για την απαλοιφή του λανθάνοντα προϊού, η επίτευξη αυτής δεν παύει να αποτελεί πρόκληση. Ειδικότερα δύο είναι οι στρατηγικές που φαίνεται να ξεχωρίζουν. Η πρώτη στοχεύει στην περιοχή LTR του ιικού γονιδιώματος, προωθώντας την ταυτόχρονη αποκοπή των δύο περιοχών. Αφαιρείται έτσι ένα εσωτερικό τμήμα του DNA του προϊού που υπάρχει στο γονιδίωμα του ξενιστή. Η δεύτερη εναλλακτική προτείνει τη δράση πάνω στα γονίδια του ιού, επιτρέποντας την τροποποίηση ορισμένων χαρακτηριστικών του HIV-1 και της



μολυσματικής του δύναμης (Lebbink et al., 2017; Liao et al., 2015; Sanches-Da-Silva et al., 2019).



**Εικόνα 15 Η επίθεση του συστήματος CRISPR/Cas9 στο DNA του προϊόν και η διαφυγή του ιού. (α)** Η στόχευση του DNA του HIV-1 με την Cas9 και ένα RNA-οδηγό που δεν στοχεύει τις αλληλουχίες LTR θα προκαλέσει δίκλωνη θραύση του DNA, η οποία στη συνέχεια θα επιδιορθωθεί από το κυτταρικό μονοπάτι NHEJ. Η επιδιόρθωση αυτή συχνά προκαλεί μεταλλάξεις (κυρίως ενθέσεις και απαλοιφές) στην περιοχή-στόχο. Μεταλλάξεις που εμποδίζουν την πρόσδεση του RNA-οδηγού, και οι οποίες είναι συμβατές με την ιική αντιγραφή, θα οδηγήσουν σε ιούς ανθεκτικούς στο σύμπλοκο Cas9/RNA-οδηγού, οι οποίοι διαφεύγουν. **(β)** Όταν χρησιμοποιείται RNA-οδηγός που στοχεύει τις αλληλουχίες LTR, τότε στοχεύεται και κόβεται τόσο η περιοχή 5' - όσο και η περιοχή 3'-LTR. Η επακόλουθη επιδιόρθωση από το μονοπάτι NHEJ μπορεί να εισαγάγει μεταλλάξεις και στις δύο περιοχές-στόχους (όπως φαίνεται στο δεξί πλαίσιο). Επιπλέον, η ταυτόχρονη πέψη και στις δύο περιοχές LTR μαζί με την επερχόμενη σύνδεση των χρωμοσωμικών άκρων μπορεί να οδηγήσει στη σχεδόν ολοκληρωμένη απαλοιφή του γονιδιώματος του HIV-1 (όπως φαίνεται στο αριστερό πλαίσιο). Ενώ παραλλαγές ιών που διαφεύγουν φαίνεται πως εμφανίζονται όταν και οι δύο περιοχές LTR μεταλλάσσονται, η αποκοπή του ιικού DNA προκαλεί οριστική απενεργοποίηση του ιού (G. Wang et al., 2018a).

Στην πρώτη προσέγγιση, η περιοχή LTR του γονιδιώματος του HIV-1 φαίνεται πως αποτελεί ένα πολύ ελκυστικό στόχο για τη θεραπευτική προσέγγιση μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9. Οι αλληλουχίες LTR απαντώνται τόσο στο 5' άκρο όσο και στο 3' άκρο του γονιδιώματος του προϊόν. Έτσι, ένα sgRNA θα στοχεύσει το γονιδίωμα του ιού σε δύο

θέσεις. Παράλληλα, η ταυτόχρονη πέψη και στις δύο περιοχές LTR με την επακόλουθη σύνδεση των χρωμοσωμικών άκρων μπορεί να οδηγήσει στην απόλυτη απαλοιφή του γονιδιώματος του HIV-1, και μάλιστα όλων των αλληλουχιών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (G. Wang et al., 2018) (Εικόνα 15β). Στα πλαίσια της προσέγγισης αυτής, αρχικά κύτταρα (293T, HeLa) μολύνθηκαν με τον ψευδότυπο HIV-1, ενώ όλα τα κύτταρα έλαβαν ένα πλασμίδιο που εξέφραζε την Cas9. Κατόπιν, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν ούτως ώστε ορισμένα να παράγουν RNA-οδηγό που θα στοχεύει στην T5, η οποία είναι παρούσα στην αλληλουχία TAR της περιοχής R, ενώ κάποια άλλα να παράγουν RNA-οδηγό που θα στόχευε στην T6, η οποία είναι παρούσα στην NF-κB αλληλουχία της περιοχής U3. Τα αποτελέσματα έπειτα αξιολογήθηκαν με τη χρήση του γονιδίου αναφοράς GFP. Ειδικότερα στα κύτταρα 293T παρατηρήθηκε σπουδαιότερη μείωση της έκφρασης ειδικά για εκείνα τα κύτταρα που έλαβαν το RNA-οδηγό έναντι του T5, όπου σημειώθηκε μείωση από 45,6% σε 20%. Αντίθετα, στα κύτταρα HeLa καταγράφηκε μικρή πτώση στην έκφραση του γονιδίου αναφοράς, λόγω χαμηλότερης αποτελεσματικότητας κατά τη διαδικασία μεταγωγής (Sanches-Da-Silva et al., 2019; G. Wang et al., 2018b).

Λίγο αργότερα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK293T, τα οποία περιείχαν διαφορετικές ποσότητες ενσωματωμένου ιικού DNA. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκε RNA-οδηγός, τόσο για την περιοχή LTR όσο και για διαφορετικούς τόπους της περιοχής που κωδικοποιεί το γονίδιο αναφοράς GFP (Liao et al., 2015). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η θεραπευτική κυττάρων με το ενσωματωμένο προϊικό DNA οδηγεί σε μετάλλαξη ή αποκοπή των ιικών αλληλουχιών. Συγκρίνοντας μάλιστα την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με χρήση μονού και διπλού RNA-οδηγού, φάνηκε πως τα τελευταία συστήματα CRISPR/Cas9 με πολλαπλούς στόχους ήταν πιο αποτελεσματικά (Liao et al., 2015; G. Wang et al., 2018a). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, αρκετές ομάδες ερευνητών απέδειξαν πως η θεραπεία με διπλά RNA-οδηγούς είχε ως αποτέλεσμα την αποτελεσματικότερη πέψη της από την Cas9 σε ένα μη ενσωματωμένο πλασμίδιο αναφοράς HIV, σε σύγκριση με τη θεραπεία χρησιμοποιώντας ένα μονό RNA-οδηγό (Lebbink et al., 2017; Sun, 2017; G. Wang et al., 2018; G. Wang et al., 2016). Η προσπάθεια πολλών ερευνητών να προκαλέσουν ρήξη του γονιδιώματος του προϊόντος διακινδυνεύει μια ενδεχόμενη επανενεργοποίησή του, γεγονός που θα αποτελούσε μεγάλο πρόβλημα για ασθενείς θετικούς στον HIV-1, οι οποίοι διακόπτουν την αντιρετροϊκή αγωγή που λαμβάνουν. Προκειμένου να εκτιμηθεί κατά πόσο είχε κατασταλεί η απενεργοποίηση του προϊόντος μετά τη θεραπεία με το σύστημα CRISPR/Cas9, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Jurkat, που

περιείχαν ενσωματωμένο DNA του HIV-1 στο γονιδιώμά τους. Αρχικά, εφαρμόστηκαν RNA-οδηγοί που στόχευαν σε διαφορετικές περιοχές του ιικού γονιδιώματος (συμπεριλαμβανομένων των *LTR*, και *pol*, *tat* και *rev* γονιδίων) σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη Cas9 (Sanches-Da-Silva et al., 2019)

Μια άλλη περίπτωση είναι ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων  $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) που αποτελεί μια προφλεγμονώδη κυτοκίνη, η οποία ενεργοποιεί τον NF $\kappa$ B μέσω ενεργοποίησης του υποκινητή της *LTR* (G. Wang et al., 2018a). Ο TNF- $\alpha$  χρησιμοποιήθηκε για την ενεργοποίηση της έκφρασης των ιικών γονιδίων, και οδήγησε στην παραγωγή των πρωτεϊνών GFP και p24. Όπως παρατηρήθηκε, η έκφραση της πρωτεΐνης αναφοράς GFP μειώθηκε μέχρι και δέκα φορές, ενώ η έκφραση της πρωτεΐνης p24 μειώθηκε έως και είκοσι φορές, ανάλογα με το RNA-οδηγό που είχε χρησιμοποιηθεί. Επιπλέον, η ταυτόχρονη χρήση πολλαπλών RNA-οδηγών οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του HIV-1 έως και κατά είκοσι τέσσερις φορές, ιδιαίτερα για τα γονίδια *tat* και *rev* (Zhu et al., 2015).

Παράλληλα, και άλλοι κυτταρικοί τύποι που αποτελούν σημαντικές δεξαμενές του ιού, όπως είναι τα αστροκύτταρα και τα μυελοειδή κύτταρα, φάνηκε πως δύνανται να επιδιορθωθούν μέσω της τεχνολογίας CRISPR/Cas9. Οι μελέτες που βασίζονται στα κύτταρα αυτά είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς ο HIV-1 εμμένει στο κεντρικό νευρικό σύστημα αποτελώντας τη μεγαλύτερη πρόκληση για την αντιρετροϊκή θεραπεία (Kunze et al., 2018).

Η πρώτη απόδειξη ότι το σύστημα CRISPR/Cas μπορούσε να εξαλείψει τους προϊούς του HIV-1 προέκυψε όταν χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο λανθάνοντων μυελοειδών κυττάρων μολυσμένων με HIV-1, σε συνδυασμό με τέσσερα πιθανά RNA-οδηγούς. Τα RNA-οδηγοί ήταν έτσι σχεδιασμένα έτσι ώστε να στοχεύουν στην U3 περιοχή της *LTR* και ορίστηκαν με τα γράμματα A έως D. Όταν στα κύτταρα χορηγήθηκε ο αναστολέας της αποκετυλάσης των ιστονών TSA προκειμένου να ενεργοποιηθεί η μεταγραφή των ενσωματωμένων προϊών, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην έκφραση της GFP. Αμέσως μετά, αξιοποιήθηκαν πολλαπλά RNA-οδηγοί, με αποτέλεσμα την παντελή απαλοιφή του τμήματος του προϊού, που βρίσκεται μεταξύ των 5'-*LTR* και 3'-*LTR*. Επιπρόσθετα, αυτή η μέθοδος προκάλεσε αρκετές ενθέσεις και απαλοιφές, οι οποίες επέφεραν την παρεμπόδιση της ικής επανενεργοποίησης και αντιγραφής (W. Hu et al., 2014).

Στο μεταξύ, επιβεβαιώθηκε ότι το σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί να επηρεάσει την ιική έκφραση σε ένα μοντέλο αστροκυττάρων, τα κύτταρα HNSC.100, που περιείχαν τον λανθάνοντα προϊό. Κατόπιν μεταγωγής τους με ένα φορέα (AAV91P1) ο οποίος έφερε αλληλουχίες για την Cas9 και τα RNA-οδηγούς, ο λανθάνων ιός HIV-1 ενεργοποιήθηκε με τον παράγοντα TNF- $\alpha$ . Η ποσοτική ανάλυση της ιικής έκφρασης έδειξε μείωση στα κύτταρα που έλαβαν την Cas9 και το RNA-οδηγό, αποδεικνύοντας την επιτυχία της επεξεργασίας. Παρατηρήθηκαν επίσης ενθέσεις και απαλοιφές στην περιοχή LTR, γεγονός που οδήγησε στην εξάλειψη του προϊού χωρίς τυχόν επιπτώσεις στο κυτταρικό γονιδίωμα ή πρόκληση κυτταροτοξικότητας (Kunze et al., 2018).

Σύμφωνα με μια εναλλακτική στρατηγική για την εξάλειψη του λανθάνοντος προϊού του HIV-1, σε κύτταρα HEK293T μολυσμένα με HIV-1 έγινε αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας χρήσης περισσότερων του ενός RNA-οδηγών για διαφορετικούς γονιδιακούς στόχους, μέσω σύγκρισης μεταξύ των RNA-οδηγών που στοχεύουν σε δομικά γονίδια (*gag* και *env*), σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα (*pol*), σε διακοσμητικά γονίδια (*vif* και *rev*) και στην περιοχή LTR. Όπως παρατηρήθηκε, σε κύτταρα τα οποία έλαβαν RNA-οδηγούς έναντι διαφορετικών στόχων, η έκφραση της GFP μειώθηκε κατά 48-92% (Liao et al., 2015). Σε άλλη περίπτωση όπου τα κύτταρα μολύνθηκαν με λεντιό που περιείχε κωδικοποιημένες πληροφορίες για την πρωτεΐνη Cas9 και για RNA-οδηγούς, οι RNA-οδηγοί που επιλέχθηκαν στοχεύαν έναντι 43 διακριτών στόχων στο γονιδίωμα του HIV-1 με χαμηλά αποτελέσματα εκτός της περιοχής-στόχου στον ξενιστή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 11 RNA-οδηγοί ειδικοί για την περιοχή LTR και 12 RNA-οδηγοί ειδικοί για άλλα γονίδια οδήγησαν σε σημαντική μείωση στην έκφραση της πρωτεΐνης p24, ενώ άλλοι έδειξαν μειωμένο ανασταλτικό αποτέλεσμα. Οι οκτώ RNA-οδηγοί με τα υψηλότερα ανασταλτικά αποτελέσματα σε συντηρημένες αλληλουχίες του HIV-1 επιλέχθηκαν για να φθάσουν σε διαφορετικές θέσεις που υπάρχουν στο ιικό γονιδίωμα και θα μπορούσαν να αξιολογηθούν μέσω διπλών μεταγωγών (Q. Wang et al., 2018). Τα πειράματα απέδειξαν ότι υπάρχουν διαφορετικοί στόχοι στο ιικό γονιδίωμα που επιτρέπουν την εξάλειψή του ιού, αλλά συμπερασματικά οι RNA-οδηγοί που στοχεύουν την περιοχή LTR φάνηκε να είναι πιο αποτελεσματικοί σε σχέση με άλλους (Liao et al., 2015; Q. Wang et al., 2018).

### 3.1.1.7 Μελλοντικές προοπτικές χρήσης του συστήματος CRISPR/Cas9 στην anti-HIV θεραπεία

Για την επιτυχή εφαρμογή της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 στη θεραπεία του ιού HIV-1 κρίνεται απολύτως απαραίτητη η αποτελεσματική παράδοση των στοιχείων που απαρτίζουν το σύστημα CRISPR/Cas9. Σημαντική είναι η παράδοση σε όλα τα μολυσμένα με HIV-1 κύτταρα, με κυριότερα τα κύτταρα που αποτελούν τις λανθάνουσες δεξαμενές του ιού κατά τη διάρκεια της αντιρετροϊκής αγωγής (LaFountaine et al., 2015; G. Wang et al., 2018a; L. Wang et al., 2016) .

Κατά προτίμηση, η παράδοση θα πρέπει να γίνεται *in vivo*, δηλαδή μέσω άμεσης χορήγησης στον ασθενή. Για αυτές τις *in vivo* εφαρμογές έχουν προταθεί στρατηγικές στόχευσης των κυττάρων. Παρόλα αυτά, η πρόσβαση σε όλα τα κύτταρα-στόχους θεωρείται απίθανη, δεδομένης της αποτελεσματικότητας των συστημάτων φορέων που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα (G. Wang et al., 2018b; Yang et al., 2006). Εκτός από *in vivo*, έχει προταθεί και μία *ex vivo* προσέγγιση στην οποία απομονώνονται T κύτταρα ή αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα από τον ασθενή. Αυτά στη συνέχεια μεταγάζονται με το θεραπευτικό φορέα *in vitro* και επαναχορηγούνται επακολούθως στον ασθενή. Η γονιδιακή αυτή θεραπεία φαίνεται να είναι περισσότερο εφικτή. Βέβαια, αυτή η *ex vivo* στρατηγική προσεγγίζει μόνο ένα μικρό κομμάτι των κυττάρων-στόχων του ασθενή που είναι μολυσμένα με τον ιό, σε αντίθεση με μία ολοκληρωμένη γονιδιακή θεραπεία που θα έπρεπε ιδανικά να επιδρά σε όλα τα μολυσμένα με HIV-1 κύτταρα. Για το λόγο αυτό είναι επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης καινοτόμων και αποτελεσματικών μεθόδων *in vivo* παράδοσης (G. Wang et al., 2018a).

Περιοριστικός παράγοντας για την παράδοση του συστήματος CRISPR/Cas9 είναι το μέγεθος του διαγονιδίου SpCas9 (~4.1 kbp), το οποίο και αποτελεί πρόβλημα σε περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται ιικοί φορείς όπως οι AAV και οι LV, οι οποίοι έχουν περιορισμένη ικανότητα αποθήκευσης της γενετικής πληροφορίας. Το εμπόδιο αυτό μπορεί να παρακαμφθεί χρησιμοποιώντας μία μικρότερου μεγέθους πρωτεΐνη Cas9 (~3.3 kbp). Αυτή μπορεί να προέρχεται από βακτήρια όπως το *S. thermophilus*, το *N. meningitidis* και το *S. aureus* (G. Wang et al., 2018a). Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια κολοβωμένη πρωτεΐνη SpCas9 από την οποία λείπουν μη απαραίτητες αλληλουχίες, όπως είναι ο τομέας REC2 (Nishimasu et al., 2014; G. Wang et al., 2018a).

Εκτός από τον τρόπο παράδοσης, ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται και κατά το σχεδιασμό των RNA-οδηγών, έτσι ώστε να στοχευθεί αποτελεσματικά το DNA του ιού HIV-1 και όχι το DNA του κυττάρου-ξενιστή. Για το σκοπό αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν εργαλεία Βιοπληροφορικής, τα οποία μπορούν να ξεχωρίσουν υποψήφια RNA-οδηγούς με υψηλή δραστικότητα εντός της περιοχής-στόχου και χαμηλή δραστικότητα εκτός αυτής (Haeussler & Concordet, 2016; Tycko et al., 2016; G. Wang et al., 2018a). Μετά την επιλογή του κατάλληλου RNA-οδηγού, η αποτελεσματικότητά του πρέπει να επαληθευτεί πειραματικά, όπως για παράδειγμα με πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες (Sun, 2017; G. Wang, Zhao, Berkhout, & Das, 2016). Παράλληλα, για να αποφευχθεί η διαφυγή του ιού, το RNA-οδηγός θα πρέπει να στοχεύει υψηλά συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος του HIV-1. Η απουσία γεγονότων διαφυγής του ιού θα πρέπει να ελέγχεται ιδανικά υπό πειραματικές συνθήκες. Η χρήση τέτοιου είδους gRNAs καθιστά δυνατή τη στόχευση διαφορετικών παραλλαγών του ιού. Δεν περιορίζονται στις παραλλαγές του ιού που μπορεί κανείς να παρατηρήσει σε ένα συγκεκριμένο ασθενή αλλά επεκτείνονται και σε άλλα στελέχη του ιού, μέχρι και σε υπότυπους.

Συμπερασματικά, το σύστημα CRISPR/Cas9 δεν παύει να αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο για την αναχαίτιση του ιού HIV-1. Τα επόμενα βήματα της γονιδιακής θεραπείας που βασίζεται στο σύστημα CRISPR θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω με τη διενέργεια κλινικών δοκιμών σε ζώα, συμπεριλαμβανομένων πρωτεύοντων πλην του ανθρώπου, πριν ξεκινήσουν οι κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους (G. Wang et al., 2018a).

### **3.1.2 Η θεραπευτική χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 ενάντια στον καρκίνο**

#### **3.1.2.1 Γενικά για τον καρκίνο**

Ο καρκίνος αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα δημόσιας υγείας σε όλο τον κόσμο. Παρά τη ραγδαία εξέλιξη όσον αφορά τη διάγνωση και τη θεραπεία του, παραμένει η κύρια αιτία θνησιμότητας που σχετίζεται με κάποια νόσο (Bray et al., 2018; X. Song et al., 2021). Πιο συγκεκριμένα, είναι η δεύτερη κατά σειρά αιτία θανάτου παγκοσμίως με 8.8 εκατομμύρια θανάτους να έχουν καταγραφεί μέχρι και το έτος 2015.

Μάλιστα, τις επόμενες δύο δεκαετίες αναμένεται αύξηση της τάξεως του 70% στην καταγραφή νέων περιστατικών καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο (Soiza et al., 2018).

Η δραματική πρόοδος που έχει σημειωθεί στην κατανόηση της βιολογίας της σύνθετης αυτής νόσου, έχει συνεισφέρει στη χορήγηση άδειας για τη δημιουργία πολλών μικρών μοριακών φαρμάκων, μονοκλωνικών αντισωμάτων (monoclonal Antibodies, mAbs) και γενετικά τροποποιημένων προϊόντων που βασίζονται σε κύτταρα με σκοπό τη θεραπεία του καρκίνου (Bray et al., 2018; X. Song et al., 2021; Wang et al., 2019). Τα επιλεγμένα αυτά στελέχη στοχεύοντας σε ογκογονικά μονοπάτια σηματοδότησης ή ρυθμίζοντας την ανοσολογική απόκριση οδηγούν σε πρωτοφανείς αντιδράσεις, ή ακόμη και στη θεραπεία των επιλεγμένων καρκινικών οντοτήτων. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα είδη καρκίνου που δεν θεραπεύονται και που οι επιλογές για την αντιμετώπισή τους είναι περιορισμένες (X. Song et al., 2021). Η συνθήκη αυτή, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι πλέον διαδεδομένες θεραπείες (χημειοθεραπεία, ραδιοθεραπεία, θεραπεία με χειρουργείο) συσχετίζονται με σοβαρές παρενέργειες και τοξικότητα που αυξάνει τη θνησιμότητα, ενώ παράλληλα μειώνει σημαντικά την ποιότητα ζωής, καθιστούν απαραίτητη την ανάπτυξη εναλλακτικών προσεγγίσεων θεραπείας (Faheem Ahmed et al., 2016; Stupp et al., 2009).

Ο καρκίνος αποτελεί μία γενετική ασθένεια, η οποία βρίσκει έδαφος ανάπτυξης σε περιπτώσεις συσσωρευμένων γονιδιωματικών/επιγονιδιωματικών παρεκκλίσεων. Προηγμένα τεχνολογικά επιτεύγματα, όπως η γονιδιακή επεξεργασία που βασίζεται στο σύστημα CRISPR/Cas9, επιτρέπουν την τροποποίηση με ακρίβεια σχεδόν κάθε γονιδιωματικής αλληλουχίας. Έτσι, καθίσταται δυνατός ο λειτουργικός διαχωρισμός των γονιδίων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση και η επιδιόρθωση μεταλλάξεων που προκαλούν καρκίνο (M. Chen et al., 2019).

Η τεχνολογία του συστήματος CRISPR/Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του καρκίνου, βρίσκοντας εφαρμογή στην ανοσοθεραπεία, στην κατευθυνόμενη αλληλούχιση του γονιδιώματος όγκων, στη χαρτογράφηση του επιγονιδιώματος και στην εξολόθρευση ή απενεργοποίηση των καρκινικών ικών μολύνσεων (Cheng et al., 2020; Mollanoori & Teimourian, 201).

### 3.1.2.2. Θεραπευτικές εφαρμογές

#### 3.1.2.2.1. Ανοσοθεραπεία κατά του καρκίνου

Η ανοσοθεραπεία αποτελεί μία ανερχόμενη θεραπευτική στρατηγική με πολλά υποσχόμενα κλινικά αποτελέσματα στους όγκους (Cheng et al., 2020). Είναι ένα ραγδαία αναπτυσσόμενο πεδίο στις μέρες μας κατά το οποίο ο όγκος δεν στοχεύεται άμεσα αλλά αντιθέτως ενεργοποιείται η προσαρμοστική ή η έμφυτη ανοσία του ασθενή προκειμένου να δράσουν ενάντια στον καρκίνο με ποικίλες στρατηγικές (M. Chen et al., 2019).

Η δημιουργία κυττάρων T χμιαϊκού υποδοχέα αντιγόνου (κύτταρα CAR-T) αποτελεί μια από τις πλέον δημοφιλείς εφαρμογές γονιδιωματικής επεξεργασίας μεσολαβούμενης από την τεχνολογία CRISPR/Cas9 στη γονιδιακή θεραπεία. Στο πλαίσιο αυτό, συλλέγονται αυτόλογα T κύτταρα τα οποία τροποποιούνται γενετικά για να επιτεθούν στα καρκινικά αντιγόνα *ex vivo*, και στη συνέχεια τα τροποποιημένα πλέον κύτταρα μεταφέρονται πίσω στον ασθενή. Η εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9 σε κύτταρα για την παραγωγή χμιαϊκού υποδοχέα αντιγόνου (Chimeric Antigen Receptor, CAR) διευρύνει σημαντικά το ποσοστό των ασθενών που μπορεί να λάβει αντικαρκινική θεραπεία βασιζόμενη σε κύτταρα CAR-T. Επιπρόσθετα, η πρωτοποριακή αυτή μέθοδος θεραπείας ενισχύει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της συμβατικής θεραπείας των όγκων (Cheng et al., 2020).

Το σύστημα CRISPR/Cas9 δύναται να βελτιώσει τη λειτουργία των κυττάρων CAR-T διακόπτοντας τα γονίδια που κωδικοποιούν υποδοχείς αναστολής των T κυττάρων ή μόρια σηματοδότησης (Cheng et al., 2020; Zych et al., 2018). Μπλοκάρονται ουσιαστικά σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού όπως είναι η πρωτεΐνη 1 προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Programmed Death cell protein 1, PD-1), ο προσδέτης 1 προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Programmed cell Death-Ligand 1, PD-L1) και η πρωτεΐνη 4 που σχετίζεται με τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (Cytotoxic T Lymphocyte-Associated protein 4, CLTA-4) (M. Chen et al., 2019; Topalian et al., 2015). Η PD-1 βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων και μπορεί να προσδεθεί στον υποδοχέα PD-1 των ενεργοποιημένων T-κυττάρων, παρεμποδίζοντας το ανοσοποιητικό σύστημα να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα (Cheng et al., 2020; Syn et al., 2017). Μελέτη απέδειξε πως με την απενεργοποίηση του γονιδίου PD-1 μειώθηκε αισθητά η έκφραση της πρωτεΐνης. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω του μετασχηματισμού ανθρώπινων κυττάρων μέσω ηλεκτροπόρωσης με πλασμίδια που κωδικοποιούν κάποιο RNA-οδηγό και την πρωτεΐνη



Cas9. Ενισχύονται έτσι οι ανοσολογικές αποκρίσεις των T κυττάρων ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, καθώς και η ικανότητά τους να τα σκοτώνουν αποτελεσματικά. Μάλιστα, κλινικές δοκιμές σχετικά με την απενεργοποίηση του γονιδίου PD-1 με τη διαμεσολάβηση του συστήματος CRISPR επικεντρώθηκαν στη θεραπεία του ανθεκτικού στον ευνοχισμό καρκίνου του προστάτη, του μυϊκού διηθητικού καρκίνου της ουροδόχου κύστης και του μεταστατικού καρκινώματος των νεφρικών κυττάρων με στόχο να εκτιμηθεί περαιτέρω η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια εφαρμογής της απενεργοποίησης της PD-1 στα κύτταρα T (M. Chen et al., 2019).

Από την άλλη πλευρά, το σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να αντικαταστήσει τα αλληλόμορφα των κύριων συμπλεγμάτων ιστοσυμβατότητας (MHC) στη θυγατρική περιοχή. Αυτή η τακτική αποτελεί μια καινοτόμα προσέγγιση για τη διόρθωση αταίριαστων κύριων συμπλεγμάτων ιστοσυμβατότητας κατά την κυτταρική μεταμόσχευση. Σε μελέτη όπου έγινε χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 προκειμένου να στοχευθεί μία καλά οριοθετημένη περιοχή του γονιδίου *B2M*, το σύστημα CRISPR/Cas9 μεσολάβησε στην απενεργοποίηση του *B2M* στα ανθρώπινα πρωτογενή CD4+ κύτταρα T, γεγονός που προκάλεσε την απώλεια έκφρασης του MHC-1 στην επιφάνεια των κυττάρων. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να παράγει άφθονα μεταβιβάσιμα T κύτταρα και έτσι εφαρμόστηκε σε πολλούς καρκινοπαθείς ανεξαρτήτως του γονότυπου του αντιγόνου του ανθρώπινου λευκοκυττάρου (Cheng et al., 2020; Quasim et al., 2015).

#### **3.1.2.2.2. Επεξεργασία (επι)γονιδιώματος καρκινικών κυττάρων**

Έχοντας υπόψιν μας το γενετικό υπόβαθρο της συγκεκριμένης νόσου, θεωρείται λογικό να οραματιζόμαστε τη διόρθωση των ογκογονικών αυτών παρεκκλίσεων από το σύστημα CRISPR/Cas9 ως μία πολλά υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική στη μάχη κατά του καρκίνου (M. Chen et al., 2019).

Το σύστημα CRISPR/Cas9 άνοιξε το δρόμο για νέες μεθόδους θεραπείας του καρκίνου της ουροδόχου κύστης στον άνθρωπο. Η καταστολή των όγκων που συσχετίζεται με γονίδια όπως η *ε-καντερίνη*, το γονίδιο *p21* και το γονίδιο *hBax* ενεργοποιήθηκε με τη μεσολάβηση του συστήματος CRISPR/Cas9 στα ουροθηλιακά καρκινωματικά κύτταρα της κύστης. Με τον τρόπο αυτό, παρεμποδίστηκε ο

πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, μειώθηκε η κινητικότητα τους και έγινε επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων. Παράλληλα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ζώα, το σύστημα CRISPR/Cas9 χρησιμοποιήθηκε για να διορθώσει τη σημειακή μετάλλαξη που δημιουργεί ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης του ομόζυγου ASXL1 η οποία συναντάται στη κυτταρική σειρά KBM5 της χρόνιας μυελοειδούς λευχαιμίας. Η κυτταρική αυτή σειρά στερείται έκφρασης της πρωτεΐνης ASXL1. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η διόρθωση της σημειακής μετάλλαξης του οδηγού γονιδίου από μόνη της στα κύτταρα λευχαιμίας αύξησε την επιβίωση των ποντικών *in vivo*. Αποδείχθηκε έτσι μέσω της μελέτης αυτής, η έννοια της διόρθωσης της μετάλλαξης του οδηγού γονιδίου μέσω της τεχνολογίας CRISPR στα κύτταρα της λευχαιμίας (Cheng et al., 2020).

Επιπλέον, το σύστημα CRISPR/Cas9 χρησιμοποιήθηκε για την αποσιώπηση του ενδογενούς γονιδίου *CDK11* σε κύτταρα οστεοσαρκώματος. Τα αποτελέσματα της επεξεργασίας έδειξαν πως η απενεργοποίηση του γονιδίου μπορεί να μειώσει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την ιδιότητά τους να επεκτείνονται στους γειτονικούς ιστούς και να διεισδύουν σε αυτούς. Ανάγουν έτσι τη μεσολαβούμενη από το CRISPR απενεργοποίηση σε μια πρωτόπορα θεραπευτική οδό για το οστεοσάρκωμα. Παρομοίως, η απενεργοποίηση του γονιδίου *SHCBP1* μέσω CRISPR/Cas9 παρεμπόδισε εμφανώς τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού προωθώντας την απόπτωσή τους (Cheng et al., 2020). Η αποσιώπηση άρα γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μειώνει αισθητά την ανάπτυξη αυτών. Παράλληλα επάγει την απόπτωσή τους, αναστέλλοντας έτσι την ανάπτυξη του όγκου (M. Chen et al., 2019).

Οι επιγονιδιωματικές τροποποιήσεις που αφορούν τον καρκίνο διαδραματίζουν κύριο ρόλο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Επηρεάζουν επίσης ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων που σχετίζονται με όγκους σε μία πληθώρα καρκινικών φαινοτύπων (Cheng et al., 2020). Στηριζόμενοι στα χαρακτηριστικά αυτά, η σχετιζόμενη με ένζυμα επιγονιδιωματική ρύθμιση θεωρείται πως είναι υποψήφιος στόχος για τη θεραπεία του καρκίνου. Επιπρόσθετα, οι δύο τομείς της ενδονουκλεάσης Cas9 μπορούν να προκαλέσουν ταυτόχρονη μετάλλαξη. Έτσι, η ενδονουκλεάση Cas9 χάνει την ικανότητά της να κόβει το DNA και ακολούθως αποκαλείται καταλυτικά ανενεργή ή «νεκρή» Cas9 (dead Cas9, dCas9). Όλο και περισσότερα στοιχεία υποδεικνύουν πως οι μεσολαβούμενες από το σύστημα CRISPR/Cas9 επιγονιδιωματικές τροποποιήσεις σε συνδυασμό με

μεταγραφική ρύθμιση μπορούν εύκολα να συμβούν χρησιμοποιώντας την dCas9. Αυτή συγχωνεύεται με διάφορους τομείς που εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση και επιγονιδιωματικούς τροποποιητές, με ή χωρίς το συνδυασμό RNA κριωμάτων που συσσωρεύονται μαζί με πρωτεΐνες-τελεστές (Cheng et al., 2020; Hilton et al., 2015; McDonald et al., 2016; Xingxing Xu et al., 2016). Βέβαια, εξαιτίας της ετερογένειας του καρκίνου, τα προφίλ γονιδιωματικής παρέκκλισης είναι διαφορετικά όχι μόνο στους όγκους μεταξύ ασθενών, αλλά και στους όγκους κατά τη διάρκεια διαφορετικών σταδίων ή σε διαφορετικές περιοχές στον ίδιο ασθενή, γεγονός που καθιστά τον επιγονιδιωματικό χειρισμό στον καρκίνο εξαιρετικά απαιτητικό. Επιπλέον, η στρατηγική αυτή απαιτεί υψηλή αποτελεσματικότητα στη γονιδιωματική επεξεργασία επειδή τα μη επεξεργασμένα κύτταρα διαθέτουν πλεονέκτημα ανάπτυξης έναντι των επεξεργασμένων κυττάρων. Τα τελευταία πολλαπλασιάζονται πιο γρήγορα αναιρώντας ταχύτατα τη θεραπευτική επίδραση (M. Chen et al., 2019).

### **3.1.2.2.3. Εξάλειψη ή απενεργοποίηση των καρκινογόνων ιικών λοιμώξεων**

Οι ιικές λοιμώξεις αποτελούν μείζονα αιτία καρκίνου με το 15-20% περίπου όλων των καρκίνων να συσχετίζονται με αυτές (Gilani et al., 2019; Muazzam Nasrullah et al., 2016). Στους ογκοϊούς περιλαμβάνονται DNA ιοί, RNA ιοί και ρετροϊοί. Η διεθνής υπηρεσία για την έρευνα στον καρκίνο έχει κατατάξει όλους τους ογκοϊούς στα καρκινογόνα τάξεως 1 (Gilani et al., 2019). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως ο ιός HIV, αν και δεν είναι από μόνος του καρκινογόνος, βρέθηκε πως σχετίζεται με αυξημένο επιπολασμό στον καρκίνο, γι' αυτό και εντάσσεται στην ομάδα των ογκοϊών (Gilani et al., 2019; Muazzam Nasrullah et al., 2018, 2016).

Η συνεισφορά των ογκοϊών στην ογκογένεση στον άνθρωπο μπορεί να είναι είτε άμεση είτε έμμεση. Πιο συγκεκριμένα, οι άμεσοι μηχανισμοί της μεσολαβούμενης από ιούς καρκινογένεσης περιλαμβάνουν το ρόλο συγκεκριμένων ιικών πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή της αναχαίτισης της απόπτωσης, ή και των δύο ταυτόχρονα. Από την άλλη, οι έμμεσοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την επαγωγή χρόνιας φλεγμονής όπως στην περίπτωση των ιών της ηπατίτιδας, την τροποποίηση των ανοσολογικών αποκρίσεων όπως στην περίπτωση του HIV και τη συσσώρευση μεταλλάξεων ή χρωμοσωμικών αλλαγών στα μολυσμένα κύτταρα (Gilani et al., 2019).

Η καρκινογόνος ιική λοίμωξη διαδραματίζει καίριο ρόλο σε περιπτώσεις καρκίνου ιογενούς αιτιολογίας, όπως είναι ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ο ιός της ηπατίτιδας Β και ο ιός της ηπατίτιδας C στον καρκίνο του ήπατος, καθώς και ο ιός Epstein-Barr στο ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, στο λέμφωμα Hodgkin και το λέμφωμα Burkitt. Η απόδειξη ότι η τεχνολογία CRISPR/Cas9 μπορεί να στοχεύσει ειδικά και να διακόψει βασικά ιικά γονίδια αποτέλεσε το έναυσμα για την εφαρμογή της σε διάφορους ιούς για τη θεραπεία του καρκίνου. Αυτοί περιλαμβάνουν εκτός από τους προαναφερόμενους EBV, HBV, HPV16, HPV18 και τον ιό Polyoma JC (JCV) (Cheng et al., 2020).

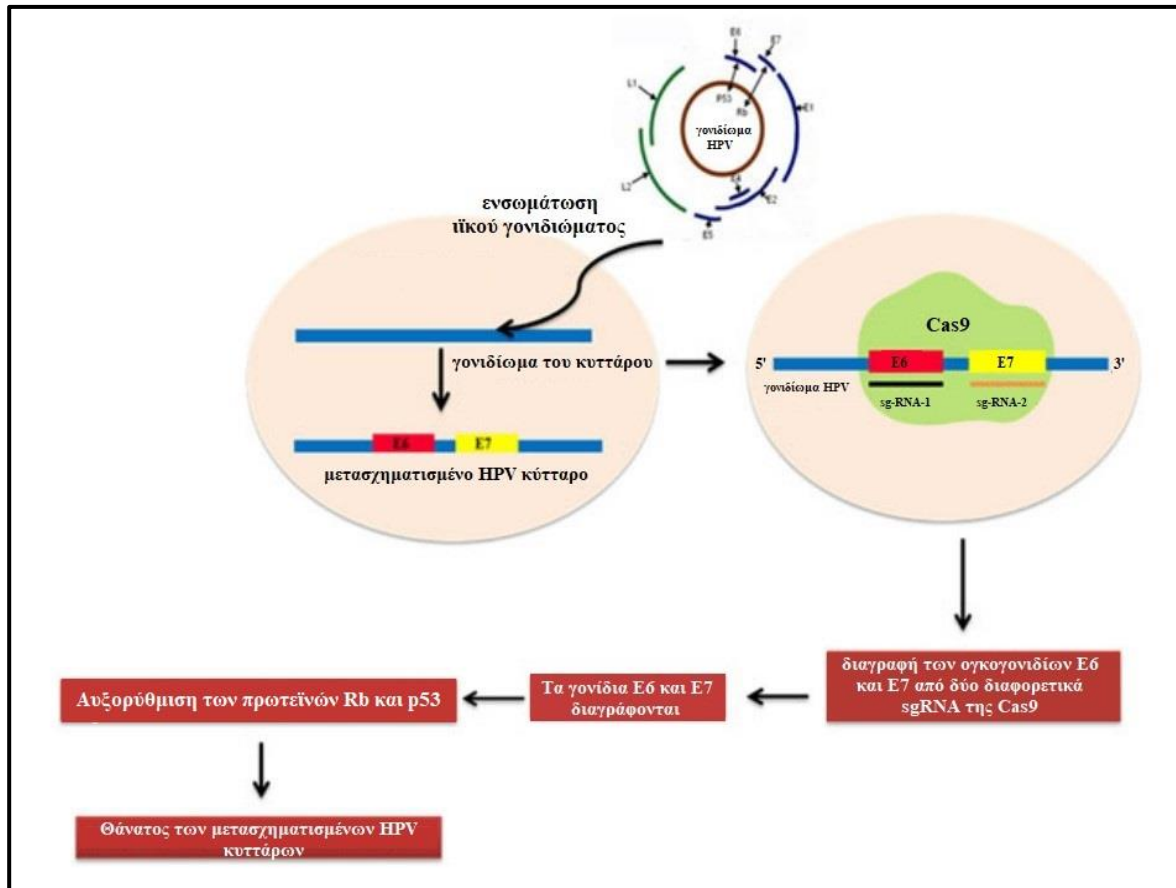
### **3.1.3. Η θεραπευτική χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 ενάντια στις ιογενείς λοιμώξεις και τις ασθένειες που προκαλούν**

#### **3.1.3.1. Ιός ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papillomavirus, HPV)**

Η λοίμωξη από κάποιον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) είναι η αιτία για αρκετούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, του καρκίνου του πέους, του καρκίνου του αιδοίου, του καρκίνου του πρωκτού και του καρκίνου του στοματοφάρυγγα (Formana et al., 2012; Gilani et al., 2019). Από το σύνολο των HPVs, οι HPV16 και HPV18 ευθύνονται για το 70% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας παγκοσμίως.

Το γονιδίωμα του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων κωδικοποιεί οκτώ πρωτεΐνες. Οι έξι από αυτές (E1, E2, E4, E5, E6 και E7) εκφράζονται στο αρχικό στάδιο της λοίμωξης ενώ δύο (L1 και L2) στο τελικό στάδιο της λοίμωξης. Οι τελευταίες είναι πρωτεΐνες του καψιδίου, ενώ οι υπόλοιπες είναι απαραίτητες για την αντιγραφή (Gilani et al., 2019). Ο ογκογονικός ρόλος των γονιδίων E6 και E7 στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχει μελετηθεί διεξοδικά (Hausen et al., 2009). Η έκφραση των συγκεκριμένων ογκοπρωτεϊνών επάγει τη μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε κακοήγη, καθώς και τη διατήρηση της κακοήθειας αυτής (M. Chen et al., 2019). Το γονίδιο E6 στοχεύει το κυτταρικό p53 ενώ το E7 στοχεύει το pRb. Τόσο η p53 όσο και η pRb αποτελούν πρωτεΐνες καταστολής των όγκων που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Beaudenon & Huibregtse, 2008; Gilani et al., 2019). Σύμφωνα με έρευνες

επιβεβαιώνεται πως στοχεύοντας τα γονίδια E6 και E7 και τους υποκινητές τους με το σύστημα CRISPR/Cas9, παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και αναστροφή του κακοήθους φαινότυπου (Shuai Zhen et al., 2016) (Εικόνα 16). Βέβαια, το μικρό μήκος των δύο αυτών γονιδίων καθιστά την επιλογή αλληλουχίας-στόχου ιδιαίτερα απαιτητική διαδικασία, γεγονός που επιβάλλει την αύξηση της εξειδίκευσης για τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα (M. Chen et al., 2019).

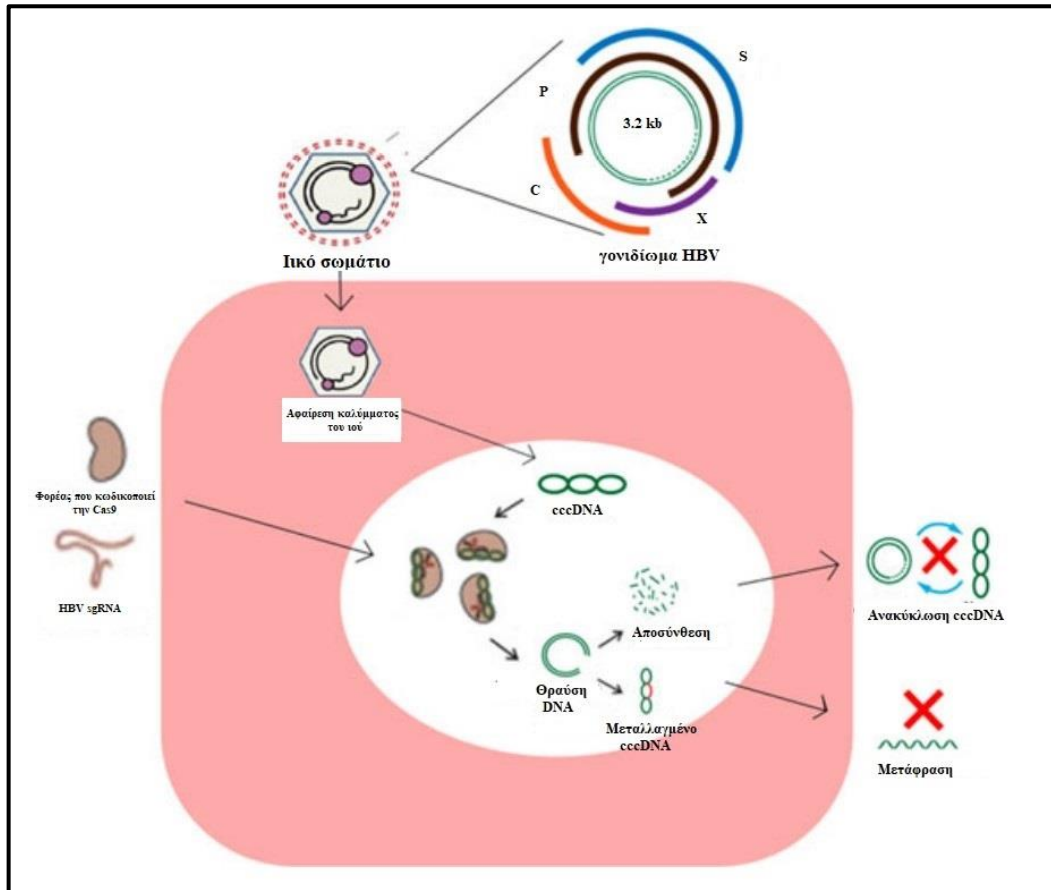


**Εικόνα 16** Η μεσολαβούμενη από το CRISPR/Cas9 διαγραφή (απαλοιφή) των γονιδίων E6 και E7 στα μετασηματισμένα HPV κύτταρα. Χρησιμοποιούνται κυτταρικές σειρές HPV για την ενσωμάτωση του ήκου γονιδιώματος. Το σύμπλοκο CRISPR/Cas9 εισάγει δύο διαφορετικά RNA-οδηγούς για τα γονίδια E6 και E7, αντίστοιχα. Η Cas9 καθοδηγούμενη από τα RNA-οδηγούς διαγράφει τα γονίδια E6 και E7, και οδηγεί σε αυξορύθμιση των ογκοσταλτικών πρωτεϊνών Rb και p53 προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου [Προσαρμογή από (Gilani et al., 2019)].

### 3.1.3.2. Ιός της ηπατίτιδας B (Hepatitis B Virus, HBV)

Ο ιός της ηπατίτιδας B (HBV) προκαλεί ένα ευρύ φάσμα ασθενειών του ήπατος που κυμαίνονται από την οξεία ή χρόνια ηπατίτιδα μέχρι και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Hepatocellular Carcinoma, HCC). Το δίκλωνο DNA του ιικού σωματίου του ιού μεταμορφώνεται σε ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την παραγωγή ιικού προ-γονιδιωματικού RNA καθώς και mRNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες.

Από προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί πως με την επεξεργασία του DNA του ιού της ηπατίτιδας B, όπως αυτή μεσολαβείται από το σύστημα CRISPR/Cas9, μπορεί να παρεμποδιστεί αποτελεσματικά ο πολλαπλασιασμός του ιού τόσο στα κύτταρα όσο και στα μοντέλα ποντικών. Βέβαια, τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται δεν είναι ακριβώς ανάλογα με τη μορφή της λοίμωξης από τον ιό HBV που εγκαθίσταται στους ανθρώπους, όπου το cccDNA του ιού συναντάται σε αφθονία στα ηπατοκύτταρα. Για το σκοπό αυτό, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν πλασμίδιο που κωδικοποιεί τον ιό HBV προκειμένου να παραχθούν μεγάλες ποσότητες cccDNA σε ποντίκια. Έτσι, είναι πιο ρεαλιστική η προσέγγιση της χρόνιας λοίμωξης από τον ιό *in vivo*. Η παράδοση του αντι-HBV συστήματος CRISPR έγινε με υδροδυναμική έγχυση στις φλέβες της ουράς των ποντικών. Το αποτέλεσμα ήταν η μείωση του cccDNA του ιού στο ήπαρ ενώ η στόχευση των περιοχών που κωδικοποιούν το αντιγόνο του HBV μέσω της τεχνολογίας CRISPR παρεμπόδισε την αντιγραφή του ιού και είχε αντι-ικό αποτέλεσμα. Συμπερασματικά λοιπόν, το κλειδί για την εξάλειψη του ιού HBV από τα μολυσμένα κύτταρα είναι το μόριο του cccDNA (M. Chen et al., 2019) (**Εικόνα 17**), ενώ η εφαρμογή των επαγόμενων από το CRISPR cccDNA μεταλλάξεων στην κλινική δοκιμή είναι υπό ανάπτυξη (Cheng et al., 2020).



**Εικόνα 17** Στόχευση του γονιδιώματος του ιού HBV χρησιμοποιώντας στρατηγικές του συστήματος CRISPR/Cas9. Το ικό σωματίο του ιού διεισδύει στο κύτταρο και στη συνέχεια αφαιρείται το κάλυμμα του. Το ικό σωματίο σχηματίζει επισωματικό DNA με την είσοδό του στον πυρήνα. Ο φορέας που κωδικοποιεί την Cas9 μαζί με το RNA-οδηγό προσδένονται στο επισωματικό DNA (cccDNA) και προκαλούν είτε την πλήρη αποσύνθεση του cccDNA είτε επάγουν τη μετάλλαξή του. Και οι δύο αυτές συνθήκες οδηγούν στην παρεμπόδιση της αντιγραφής και μετάφρασης του γονιδιώματος του ιού HBV [Προσαρμογή από (Gilani et al., 2019)].

### 3.1.3.3. Ιός Epstein-Barr (Epstein-Barr Virus, EBV)

Ο ιός Epstein-Barr είναι ερπητοϊός που σχετίζεται με πληθώρα κακοηθειών όπως το λέμφωμα Hodgkin, το λέμφωμα Burkitt, το ρινοφαρυγγικό και το γαστρικό καρκίνωμα. Προσβάλλει κυρίως τα επιθηλιακά και τα B κύτταρα (Gilani et al., 2019). Το γονιδίωμα του ιού κωδικοποιεί περίπου 85 πρωτεΐνες οι οποίες παράγουν νέα ιικά σωματίδια κατά τη διάρκεια του λυτικού κύκλου. Παράλληλα, ο ιός κωδικοποιεί επίσης 25 microRNAs, εκ των οποίων τα 22 μεταγράφονται από την περιοχή BART. Αυτά τα miRNAs εμπλέκονται στην καρκινογένεση και διαφεύγουν της ανοσολογικής απόκρισης. Ωστόσο, κατά τη

διάρκεια της λανθάνουσας περιόδου, ο ιός Epstein-Barr παράγει μόνο πυρηνικά αντιγόνα (Epstein-Barr Nuclear Antigens, EBNA) και τις πρωτεΐνες λανθάνουσας μεμβράνης 1 και 2 (Latent Membrane Protein 1, LMP-1 και Latent Membrane Protein 2, LMP-2). Αυτά τα αντιγόνα βοηθούν το γονιδίωμα του ιού να παραμένει είτε επισωματικά (κυκλικό DNA) στον πυρήνα, είτε ενσωματωμένο στο χρωμόσωμα του ξενιστή, οδηγώντας σε κυτταρικό μετασχηματισμό και ογκογένεση. Όταν τα υπό λανθάνουσα μόλυνση κύτταρα υποβάλλονται σε λυτικό κύκλο, ο EBV ξεκινά την παραγωγή πρώιμων αντιγόνων που ακολουθείται από την αντιγραφή του ιικού DNA και την παραγωγή όψιμων ιικών πρωτεϊνών, που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο και απελευθέρωση ώριμων ιικών σωμάτων (Gilani et al., 2019).

Η στόχευση του γονιδιώματος του ιού Epstein-Barr με το σύστημα CRISPR/Cas9 αποδείχθηκε πως είναι εφικτή. Για παράδειγμα, σε ασθενείς με λέμφωμα Burkitt απομονώθηκαν κύτταρα της B κυτταρικής σειράς με λανθάνουσα EBV λοίμωξη. Στη συνέχεια εισήχθησαν σε αυτά ταυτόχρονα μέσω διαμόλυνσης επτά αντι-HBV RNA-οδηγοί με στόχο να διακόψουν το γονιδίωμα του ιού. Το αποτέλεσμα ήταν η αναχαίτιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η επαγωγή της απόπτωσης. Παρατηρήθηκε επίσης μείωση του ιικού φορτίου. Αντίστοιχα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της επιμόλυνσης με φορέα εκλογής το λεντοϊό στοχεύθηκαν τα γονίδια του ιού που είναι απαραίτητα για την επισωματική διατήρηση. Η πλειοψηφία του γονιδιώματος του ιού εξαλείφθηκε σε EBV-θετικά κύτταρα λεμφώματος, σε ποσοστό μέχρι και 95%.

#### **3.1.3.4. Ανθρώπινος νευροτροπικός πολιοϊός, human neurotropic polyoma virus (JC virus, JCV)**

Ο ανθρώπινος νευροτροπικός πολιοϊός, JC (JCV), μπορεί να προκαλέσει προοδευτική πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια (Progressive Multifocal Leukoencephalopathy, PML). Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν αποτελεσματικές επιλογές θεραπείας για την προοδευτική πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια στις κλινικές και η προοδευτική μορφή αυτής της ασθένειας μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο του ασθενούς σε διάστημα από λίγους μήνες έως 2 έτη (Cheng et al., 2020).

Πλέον, το σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί να εφαρμοστεί ώστε να μεσολαβήσει άμεσα στη διάσπαση του γονιδιώματος του ιού JCV σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, γεγονός που παρέχει μια πιθανή θεραπευτική στρατηγική χρήσης του για την



καταπολέμηση της PML (Cheng et al., 2020; Chou et al., 2016). Χρησιμοποιώντας το σύστημα CRISPR/Cas9 απενεργοποιήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί το αντιγόνο T, με επακόλουθο την αναστολή της αντιγραφής του ιού σε μετασχηματισμένα ανθρώπινα γλοιακά κύτταρα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής παρέχουν μια νέα προοπτική ότι το CRISPR/Cas9 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας καινοτόμος θεραπευτικός παράγοντας έναντι του ιού JCV στο εγγύς μέλλον. Ωστόσο, χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να αξιολογηθεί η εφαρμοσιμότητα και η ασφάλεια στο μέλλον (Cheng et al., 2020).

Αυτές οι μελέτες καταδεικνύουν τις δυνατότητες του συστήματος CRISPR/Cas9 στην πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου που συνδέεται με ιογενή λοίμωξη. Βέβαια η υψηλή μεταβλητότητα που χαρακτηρίζει τους ιικούς στόχους δυσχεραίνει το θεραπευτικό έργο της τεχνολογίας CRISPR και επιτάσσει την ταυτόχρονη στόχευση πολλαπλών θέσεων στο γονιδίωμα του ιού (M. Chen et al., 2019).

### **3.1.4. Προοπτικές εφαρμογής του συστήματος CRISPR/Cas9 στη θεραπεία αιματολογικών διαταραχών**

Αρκετές γενετικές ασθένειες του αίματος (όπως για παράδειγμα οι σοβαρές συνδυασμένες ανοσοανεπάρκειες, η β-θαλασσαιμία και η δρεπανοκυτταρική νόσος) μπορούν να θεραπευτούν με αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων μετά από απομόνωσή τους από έναν υγιή δότη. Βέβαια, δεν είναι διαθέσιμοι ιστοσυμβατοί δότες για μια μεγάλη μερίδα του πληθυσμού που νοσεί και επιπλέον η νόσος μοσχεύματος έναντι ξενιστή όπως ονομάζεται (Graft-versus-Host Disease, GvHD) αποτελεί σοβαρή επιπλοκή που σχετίζεται με τις αλλογενείς μεταμοσχεύσεις (Jensen et al., 2019). Ακόμη, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος απόρριψης του μοσχεύματος και θνησιμότητας που σχετίζεται με τη διαδικασία της μεταμόσχευσης (H. Zhang & McCarty, 2016). Για τους λόγους αυτούς, το ενδιαφέρον έχει στραφεί σε συστήματα γονιδιωματικής επεξεργασίας με επικρατέστερο το σύστημα CRISPR/Cas9. Παρακάτω θα εξετάσουμε την εφαρμογή του για τη θεραπεία μη καρκινικών αιματολογικών διαταραχών (Jensen et al., 2019).

### 3.1.4.1. Β-θαλασσαιμία

Η β-θαλασσαιμία αποτελεί μια από τις πιο κοινές κληρονομούμενες διαταραχές του αίματος. Το γονίδιο της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης βήτα (*HBB*, επίσης γνωστή και ως β-σφαιρίνη) των ατόμων που πάσχουν από β-θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις. Η μειωμένη έκφραση της β-σφαιρίνης προκαλεί συσσώρευση αλυσίδων α-σφαιρίνης, οδηγώντας σε αναποτελεσματική ερυθροποίηση και επομένως σοβαρή αναιμία (Finotti et al., 2015; Ribeil et al., 2013; H. Zhang & McCarty, 2016). Η μόνη αξιόπιστη καθιερωμένη θεραπεία είναι η αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, μόνο σε περίπτωση που ταυτοποιηθεί ανθρώπινο αντιγόνο λευκοκυττάρων (Human Leucocyte Antigen, HLA) από υγιή δότη (Jensen et al., 2019).

Το σύστημα CRISPR/Cas9 έχει τεθεί σε εφαρμογή για τη διόρθωση μεταλλάξεων που ευθύνονται για την εκδήλωση ασθενειών στο γονίδιο *HBB*. Ειδικότερα, συνδυάζοντας ένα τρανσποζόνιο piggyBac<sup>10</sup> με το CRISPR/Cas9 επιτεύχθηκε, η διόρθωση επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων ασθενών για δύο διαφορετικές μεταλλάξεις της β-θαλασσαιμίας στο γονίδιο της β-σφαιρίνης. Τα διορθωμένα πλέον επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα δεν παρουσίαζαν μεταλλάξεις εκτός της περιοχής-στόχου, ενώ η διαφοροποίησή τους σε ερυθροκύτταρα επιβεβαίωσε τη φυσιολογική έκφραση του γονιδίου *HBB*. Το μειονέκτημα είναι πως οι διορθώσεις γονιδίου που είναι εξατομικευμένες για μεταλλάξεις μεμονωμένων ασθενών αποτυπώνονται δύσκολα στην κλινική πράξη εξαιτίας των οικονομικών πόρων που χρειάζονται για την ανάπτυξή τους και την έγκριση που χρειάζεται για τη χρήση αντιδραστηρίων ειδικών για τη μετάλλαξη αντιδραστηρίων (Jensen et al., 2019).

Εκτός από τον προαναφερόμενο τρόπο εφαρμογής του συστήματος CRISPR/Cas9 εξετάζεται και μία άλλη διαφορετική προσέγγιση. Η μέθοδος αυτή στοχεύει στην επανενεργοποίηση των γονιδίων *HBG1* και *HBG2* της γ-σφαιρίνης, τα οποία μαζί με την α-σφαιρίνη αποτελούν την εμβρυική αιμοσφαιρίνη. Η τελευταία εκφράζεται φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης και της πρώιμης βρεφικής ηλικίας, αλλά μετά το πέρας της περιόδου αυτής αντικαθίσταται από την αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων.

---

<sup>10</sup> Το τρανσποζόνιο piggyBac (PB) έχει χρησιμοποιηθεί σε μια σειρά βιολογικών εφαρμογών. Η εισαγωγή τρανσποζονίων PB στο γονιδίωμα μπορεί να διαταράξει γονίδια ή ρυθμιστικές περιοχές, επηρεάζοντας την κυτταρική λειτουργία. Γι' αυτό και η χρήση του πρέπει να ελέγχεται στενά (Z. Qi et al., 2017).

Μία καλοήθης κατάσταση που ονομάζεται κληρονομική παραμονή της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (Hereditary Persistence of Fetal Haemoglobin, HPFH) έχει αποδειχθεί πως βελτιώνει τόσο τη β-θαλασσαιμία όσο και τη δρεπανοκυτταρική νόσο. Τίθεται σε εφαρμογή το σύστημα CRISPR/Cas9 με σκοπό να διαρρήξει είτε το γονίδιο *BCL11A* είτε τις περιοχές πρόσδεσής του, καθώς η έκφραση των γονιδίων *HBG1* και *HBG2* ελέγχεται από τον μεταγραφικό καταστολέα *BCL11A*. Ειδικότερα, καταγράφηκαν συχνότητες επεξεργασίας αλληλομόρφων της τάξεως του 15-30% σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα CD34+. Τα ευρήματα αυτά συσχετίστηκαν και με επακόλουθη αύξηση των επιπέδων της γ-σφαιρίνης σε διαφοροποιημένα ερυθροκύτταρα, γεγονός που αντανακλά τα χαρακτηριστικά του επιθυμητού φαινοτύπου που συναντάται στους ανθρώπους με HPFH (Jensen et al., 2019).

#### **3.1.4.2. Δρεπανοκυτταρική νόσος (Sickle cell disease, SCD)**

Η δρεπανοκυτταρική νόσος αποτελεί μαζί με τη β-θαλασσαιμία μια παγκόσμια επιβάρυνση στον τομέα της υγείας, ειδικά στις υποανάπτυκτες χώρες (H. Zhang & McCarty, 2016). Πρόκειται για μία αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή η οποία προκαλείται από αντικατάσταση βάσης στο γονίδιο *HBB*. Συγκεκριμένα, το νουκλεοτίδιο της αδενίνης (A) αντικαθίσταται από το νουκλεοτίδιο της θυμίνης (T) (το κωδικόνιο GAG αλλάζει σε GTG), και έτσι στη θέση 6 της πρωτεΐνης το γλουταμινικό οξύ αντικαθίσταται από βαλίνη. Το αποτέλεσμα της μετάλλαξης αυτής είναι τα παραμορφωμένα (σε σχήμα δρεπανιού) ερυθρά κύτταρα, εξαιτίας του πολυμερισμού της αιμοσφαιρίνης, με εξαιρετικά μειωμένη διάρκεια ζωής, γεγονός που προκαλεί αιμολυτική αναιμία. Επιπρόσθετα τα παραμορφωμένα ερυθρά λόγω του ασυνήθιστου σχήματός τους φράσσουν τα τριχοειδή αγγεία, οδηγώντας σε ισχαιμία, πολυ-οργανική βλάβη και εγκεφαλικά επεισόδια.

Η SCD αποτελεί ιδιαίτερα ελκυστική περίπτωση νόσου για γενετική διόρθωση ακριβείας μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9, γιατί οι ασθενείς φέρουν την ίδια γενετική μετάλλαξη. Πρόσφατα, αποδείχθηκε πως αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα ασθενών με SCD μπορούσαν να διορθωθούν για την κληρονομούμενη μετάλλαξη. Πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη παράδοση του RNP της Cas9 με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης μαζί με έναν ομόλογο δότη είτε με τη μορφή μονόκλωνων ολιγοδεοξυνουκλεοτιδίων (single-stranded Oligodeoxynucleotides, ssODNs), είτε με τη χρήση φορέων AAV. Με αυτές τις προσεγγίσεις, το 20-50% των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων φάνηκε πως επανήλθε στον

αρχικό φυσικό τύπο του (wild type). Από τη μελέτη αυτή επιβεβαιώθηκε επίσης πως τα επιδιορθωμένα κύτταρα θα μπορούσαν πράγματι να διαφοροποιηθούν σε ερυθροκύτταρα που εκφράζουν την αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων, παρέχοντας έτσι απόδειξη της έννοιας της μεταγραφής και της μετάφρασης των διορθωμένων *HBB* αλληλομόρφων (Dever et al., 2018; Jensen et al., 2019). Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν και από πιο πρόσφατα αποτελέσματα, που έδειξαν πως η έκφραση της αιμοσφαιρίνης Α (HbA) στα ερυθροκύτταρα παρατηρήθηκε 16-20 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση γονιδιακά διορθωμένων ανθρώπινων αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων σε ένα νέο ανοσοανεπαρκές στέλεχος ποντικού που υποστηρίζει την ανάπτυξη ανθρώπινων ερυθροκυττάρων (Magis et al, 2018). Τέλος, το σημαντικότερο εύρημα ήταν ότι τα ποσοστά γονιδιακής επιδιόρθωσης ξεπέρασαν το 5% στα μακροπρόθεσμα ανανεώσιμα HSCs, το οποίο είναι και το εκτιμώμενο ελάχιστο επίπεδο επιδιόρθωσης που απαιτείται για να υπάρξει θεραπευτικό όφελος (Jensen et al., 2019).

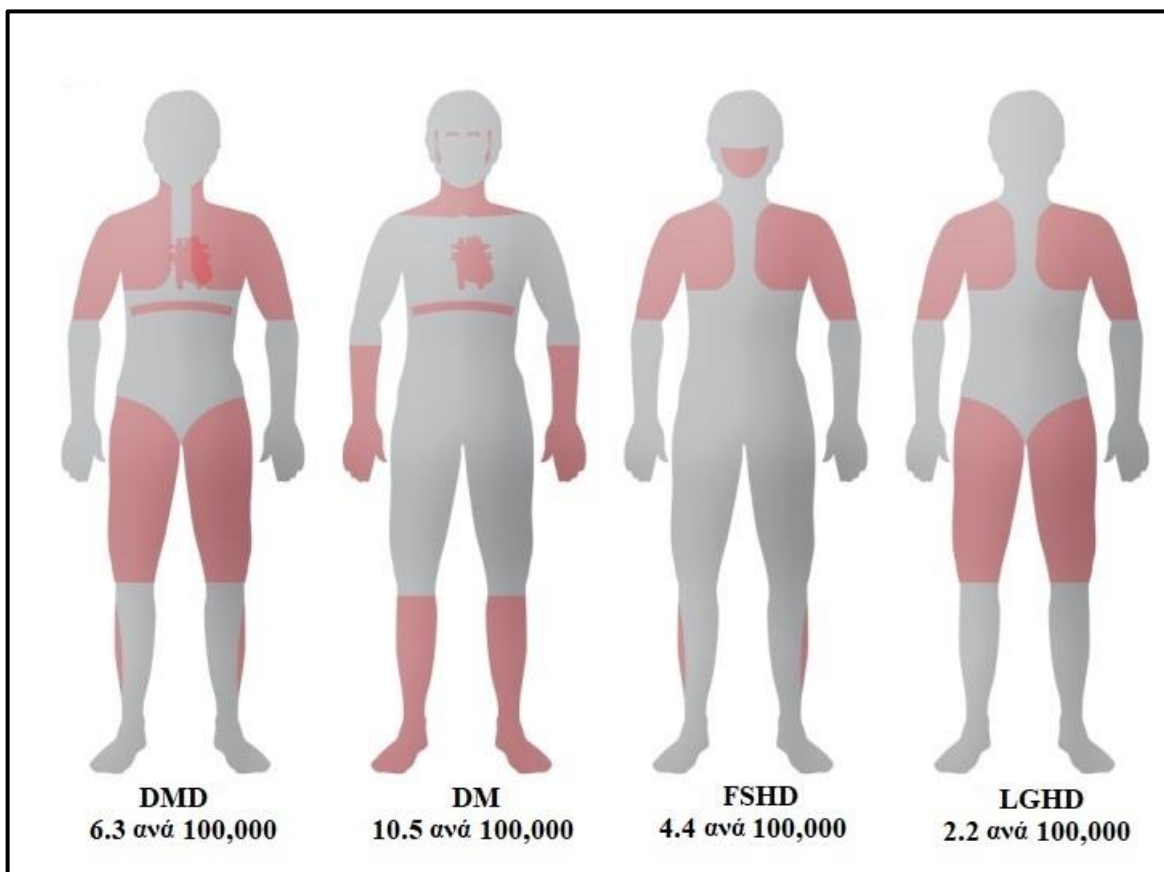
### **3.1.4.3. Βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια συνδεόμενη με το χρωμόσωμα X (X-linked Severe Combined Immunodeficiency, X-SCID)**

Η βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια που συνδέεται με το χρωμόσωμα X (X-SCID) είναι γενετική διαταραχή που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *IL2RG* που κωδικοποιεί την αλυσίδα  $\gamma$  του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2 (*IL2R $\gamma$* ). Η αλυσίδα  $\gamma$  είναι μια υπομονάδα που μοιράζονται οι υποδοχείς για IL2, IL4, IL7, IL9, IL15 και IL21. Η έλλειψη αυτών των υποδοχέων οδηγεί σε ελαττωματική σηματοδότηση κυτοκινών, με αποτέλεσμα την πλήρη ανεπάρκεια (ή τον σημαντικά μειωμένο αριθμό) T κυττάρων και κυττάρων φυσικών φονέων (NK), καθώς και μη λειτουργικών B κυττάρων. Η έλλειψη προσαρμοστικής ανοσίας καθιστά τους ασθενείς ανίκανους να καταπολεμήσουν λοιμώξεις από βακτήρια, ιούς και μύκητες. Η μόνη θεραπεία είναι η μεταμόσχευση μυελού των οστών ή η *ex vivo* ρετροϊκή γονιδιακή θεραπεία. Η τελευταία, έχει στιγματιστεί αρνητικά και δεν προτιμάται αφού οι έξι από τους 20 ασθενείς που έλαβαν αυτή τη θεραπεία, αποτέλεσαν τα πρώτα περιστατικά λευχαιμίας από γονιδιακή θεραπεία με χρήση ρετροϊών στις αρχές της δεκαετίας του 2000 (Jensen et al., 2019). Ταυτόχρονα, ένας εκ των ασθενών ανέπτυξε λευχαιμία 15 χρόνια μετά την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας. Το περιστατικό αυτό επισημαίνει το πόσο σημαντική είναι η μακροχρόνια παρακολούθηση ασθενών που θεραπεύτηκαν με καινοτόμες γενετικές θεραπείες.

Παρόλο που οι περισσότεροι ασθενείς που θεραπεύονται με ρετροϊκούς φορείς που ενσωματώνονται έχουν δείξει αξιοσημείωτο κλινικό όφελος, η στοχευμένη επεξεργασία του γονιδιώματος με το σύστημα CRISPR/Cas9 φαίνεται πως μπορεί να ενισχύσει την ακρίβεια και την ασφάλεια της γονιδιακής θεραπείας. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη που στόχευε στη διόρθωση της επιδιόρθωσης της X-SCID μέσω CRISPR/Cas9, ενσωματώθηκε ένα βελτιστοποιημένο κωδικόνιο cDNA *IL2RG* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού στο ενδογενές κωδικόνιο έναρξης *IL2RG*. Με αυτήν τη μέθοδο, σημειώθηκε ακριβής και αποτελεσματική ενσωμάτωση του cDNA στα κύτταρα CD34+ HSPC με μέση συχνότητα στόχευσης περίπου ίση με 45%. Οι δοκιμές *in vitro* έδειξαν πλήρη ικανότητα σηματοδότησης της εκφραζόμενης *IL2Rγ* υπομονάδας. Δοκιμασίες διαφοροποίησης και μακροπρόθεσμη μεταμόσχευση σε ποντίκια επιβεβαίωσαν τη διατηρημένη μακροπρόθεσμη ισχύ των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων CD34+ HSPCs. Η μελέτη αυτή παρέχει μια προ-κλινική απόδειξη για τη χρήση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 στα πλαίσια της ειδικής και αποτελεσματικής θεραπείας της X-SCID (Jensen et al., 2019).

### **3.1.5. Προοπτικές εφαρμογής του συστήματος CRISPR/Cas9 στη θεραπεία μυϊκών δυστροφιών (Muscular Dystrophies, MDs)**

Οι μυϊκές δυστροφίες (MDs) περιλαμβάνουν ένα σύνολο διαταραχών που αφορούν τη λειτουργία διαφορετικών μυϊκών ομάδων. Τα συμπτώματα αυτών περιλαμβάνουν μυϊκή αδυναμία, μυϊκή ατροφία, σπασμούς, μυϊκή υπερτονία και μυαλγίες (**Εικόνα 18**). Επιπλέον, η πλειοψηφία των διαταραχών αυτών συνδέεται με καρδιακή ανεπάρκεια και αναπνευστική δυσλειτουργία, οδηγώντας σε πρόωρο θάνατο. Οι ανθρώπινες μυϊκές δυστροφίες σχετίζονται με πάνω από 800 μονογονιδιακές μεταλλάξεις. Η πλειοψηφία των σχετικών γονιδίων κωδικοποιεί δομικές πρωτεΐνες των μυών.



**Εικόνα 18 Μυϊκές δυστροφίες και μυϊκές ομάδες που αυτές επηρεάζουν.** Με κόκκινο παρουσιάζονται οι μυϊκές ζώνες που πλήττονται κατά την εκάστοτε μορφή της νόσου. Με DMD συμβολίζεται η μυϊκή δυστροφία Duchenne (DMD). Με τον όρο DM αναφέρεται η μυοτονική δυστροφία (Myotonic Dystrophy, DM). Με τον όρο FSHD (Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy, FSHD) αναγράφεται η πρόσωπο-ώμο-βραχιόνιος μυϊκή δυστροφία (Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy, FSHD). Η μυϊκή δυστροφία των άκρων-ζωνών συμβολίζεται με LGMD (Limp-Girdle Muscular Dystrophy). Οι αριθμοί δείχνουν τον επιπολασμό της κάθε νόσου [Προσαρμογή από (Chemello et al., 2020)]

Μέχρι και σήμερα, δεν υπάρχει θεραπεία για καμία διαταραχή αυτής της κατηγορίας. Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί θεραπείες για τη βελτίωση των συμπτωμάτων της νόσου. Αυτές χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: (α) θεραπείες που τροποποιούν την ασθένεια, (β) θεραπείες γονιδιακής έκφρασης, και (γ) θεραπείες υποκατάστασης γονιδίων (Chemello et al., 2020). Παρόλο που οι θεραπευτικές αυτές προσεγγίσεις έχουν δώσει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα *in vitro* και *in vivo*, με ορισμένες εξ' αυτών μάλιστα να οδηγούν σε συνεχιζόμενες κλινικές δοκιμές, όλες έχουν αξιοσημείωτους περιορισμούς. Πρώτον, δεν εξαλείφουν τη μετάλλαξη που προκαλεί την ασθένεια και η μεταλλαγμένη μη λειτουργική πρωτεΐνη είναι παραμένει παρούσα. Δεύτερον, η αποτελεσματικότητά τους είναι προσωρινή, οπότε οι ασθενείς πρέπει να υποβάλλονται σε θεραπεία εφόρου ζωής.

Τρίτον, στις θεραπείες υποκατάστασης γονιδίων, η έκφραση της εξωγενούς πρωτεΐνης περιορίζεται στην έκφραση μέσω ενός εξωγενούς υποκινητή, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε προβλήματα αναφορικά με τον εντοπισμό της πρωτεΐνης και τα επίπεδα έκφρασης (Asher et al., 2020; Chemello et al., 2020; Duan, 2018). Η έλλειψη επομένως αποτελεσματικών θεραπειών τονίζει την ανάγκη για νέες ανακαλύψεις και στρατηγικές θεραπείας. Η τεχνολογία CRISPR/Cas9 φαίνεται να ξεχωρίζει προσφέροντας μια σχετικά απλή, ακριβή και αποτελεσματική μέθοδο για την τροποποίηση του γονιδιώματος.

Στη συνέχεια θα περιγράψουμε διάφορες στρατηγικές για την άσκηση γονιδιωματικής επεξεργασίας στους μύες μέσω του συστήματος CRISPR, ενώ θα επικεντρωθούμε στη θεραπεία της μυϊκής δυστροφίας Duchenne (Duchenne muscular dystrophy, DMD) χρησιμοποιώντας την ως πρότυπο μυϊκής δυστροφίας (Chemello et al., 2020).

### **3.1.5.1. Μυϊκή δυστροφία Duchenne (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD)**

Η μυϊκή δυστροφία Duchenne (DMD) είναι μία ασθένεια προοδευτικής αδυναμίας των σκελετικών και καρδιακών μυών (Falzarano et al., 2015). Συνδέεται με το χρωμόσωμα X και επηρεάζει περίπου 1/3500–1/5000 γεννήσεις ανδρών στις Η.Π.Α, καθιστώντας την μία από τις πιο κοινές θανατηφόρες γενετικές ασθένειες (Guiraud et al., 2015). Η διάγνωση γίνεται συνήθως μεταξύ 2 και 5 ετών. Οι ασθενείς με DMD συνήθως χάνουν την ικανότητα αυτόνομης βάδισης στα εφηβικά τους χρόνια και ο πρόωρος θάνατος συμβαίνει συχνά κατά την τρίτη δεκαετία της ζωής λόγω αναπνευστικών και καρδιακών επιπλοκών (Robinson-Hamm & Gersbach, 2016).

#### **3.1.5.1.1. Αιτιολογικός παράγοντας εμφάνισης της νόσου**

Το γονίδιο *DMD* είναι το μεγαλύτερο γονίδιο στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Εδράζεται στο χρωμόσωμα X και αποτελείται από 79 εξόνια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη δυστροφίνη. Στα μυϊκά κύτταρα, η δυστροφίνη είναι ένα από τα κύρια συστατικά του συμπλόκου δυστροφίνης-γλυκοπρωτεΐνης (Dystrophin-Glycoprotein Complex, DGC), που συνδέει το σαρκομέριο με το σαρκεΐλημα. Στο DGC, η δυστροφίνη λειτουργεί ως αμορτισέρ, μειώνοντας τη μηχανική καταπόνηση που επάγει η μυϊκή συστολή.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *DMD* που προκαλούν απώλεια ή δυσλειτουργία της δυστροφίνης ευθύνονται για την εμφάνιση δύο κύριων φαινότυπων: τη μυϊκή δυστροφία Duchenne (*DMD*) ή τη μυϊκή δυστροφία Becker (*Becker Muscular Dystrophy, BMD*). Η πρώτη προκαλείται από μεταλλάξεις που διαταράσσουν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (*Open Reading Frame, ORF*) της δυστροφίνης, και που οδηγούν σε κολοβωμένα, δυσλειτουργικά και ασταθή προϊόντα πρωτεΐνης. Οι μεταλλάξεις *DMD* περιλαμβάνουν απαλοιφές εξωνίων (αφορούν το 68,8% των περιπτώσεων), αντιγραφές εξωνίων (αφορούν το 11,2% των περιπτώσεων), σημειακές μεταλλάξεις (αφορούν το 10,4% των περιπτώσεων) και μικρές απαλοιφές/ενθέςεις (αφορούν το 9,6% των περιπτώσεων). Αν και πάνω από 7000 μεταλλάξεις του γονιδίου *DMD* έχουν συσχετιστεί με τη μυϊκή δυστροφία Duchenne, σε ασθενείς με *DMD*, οι μεταλλάξεις φαίνεται πως εντοπίζονται σε «θερμές περιοχές» (*hotspot*) του γονιδίου, οι οποίες βρίσκονται κυρίως στις περιοχές που κωδικοποιούν τον τομέα πρόσδεσης ακτίνης-1 (*Actin-Binding Domain-1, ABD-1*) και την κεντρική περιοχή ράβδου (Chemello et al., 2020; Echigoia et al., 2018).

### **3.1.5.2. Στρατηγικές επεξεργασίας του γονιδίου *DMD* με τη βοήθεια του συστήματος CRISPR/Cas9**

Οι γενετικές τροποποιήσεις που απαιτούνται για την επιδιόρθωση των μεταλλάξεων *DMD* μέσω άσκησης γονιδιωματικής επεξεργασίας στους μύες μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις κατηγορίες: απαλοιφή εξωνίου, παράκαμψη εξωνίου, αναδιαμόρφωση εξωνίου και τροποποιήσεις βάσεων. Αυτές οι αλλαγές στο γονιδίωμα μπορούν να επιτευχθούν με τη χρήση του ‘*myoediting*’<sup>11</sup> και με προσεκτική επιλογή της πρωτεΐνης Cas. Απαιτείται επίσης τεκμηριωμένος σχεδιασμός των RNA-οδηγών για τη βελτιστοποίηση του αποτελέσματος γονιδιωματικής επεξεργασίας. Στην **Εικόνα 19** παρουσιάζονται οι τρεις κύριες στρατηγικές τύπου «*myoediting*» και τα αποτελέσματα αυτών (Chemello et al., 2020).

Οι μέθοδοι αυτές εφαρμόζονται σε ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (*induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs*). Τα ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα απομονώνονται από δείγματα ασθενών, όπως για παράδειγμα τα μονοπύρρηνα

---

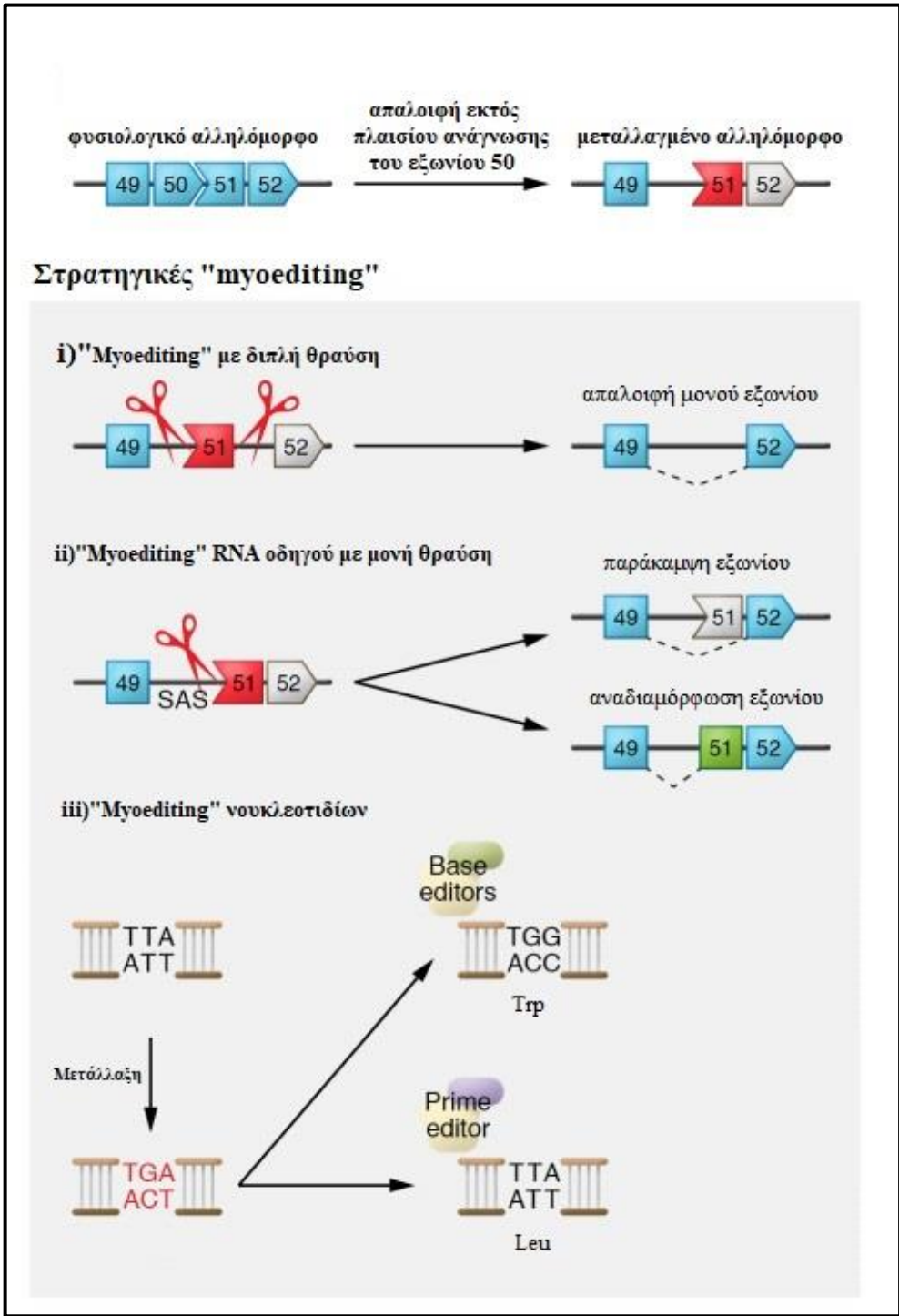
<sup>11</sup>Ο όρος αναφέρεται στη μεσολαβούμενη από το CRISPR γονιδιωματική επεξεργασία στους μύες για τη μόνιμη επιδιόρθωση των γονιδιωματικών μεταλλάξεων που ευθύνονται για τις μυϊκές δυστροφίες και την αποκατάσταση της λειτουργίας των μυών (Chemello et al., 2020).



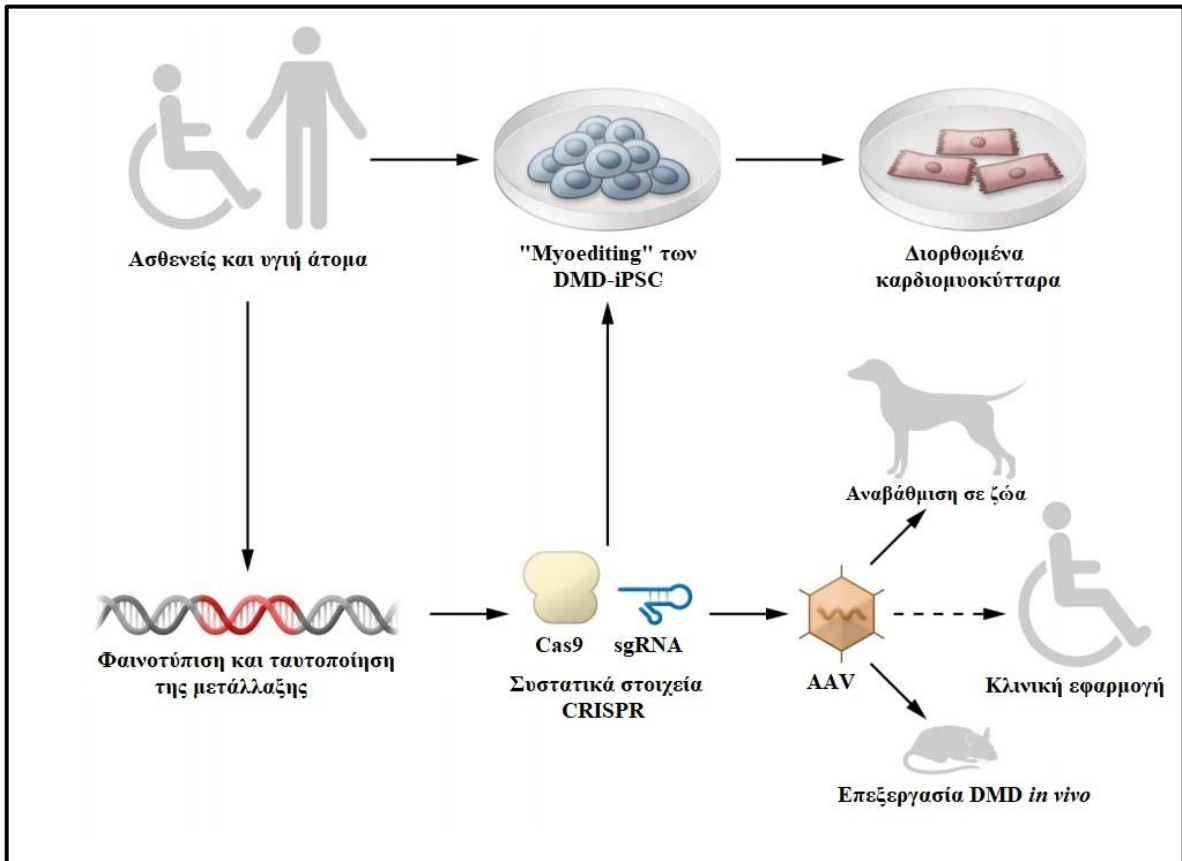
κύτταρα του περιφερικού αίματος, και εν συνεχεία διαφοροποιούνται στους κατάλληλους κυτταρικούς τύπους για έλεγχο, όπως καρδιομυοκύτταρα και μυοσωλήνες. Επιπλέον, ένας εναλλακτικός τρόπος εξασφάλισης iPSCs είναι να απομονωθούν από υγιή άτομα και στη συνέχεια να τροποποιηθούν με τη βοήθεια της τεχνολογίας CRISPR ώστε να προκληθούν μεταλλάξεις στο γονίδιο DMD. Με τον τρόπο αυτό παράγονται επαγόμενα DMD (induced DMD, iDMD) iPSCs. Δημιουργείται με αυτό τον τρόπο μια ισογονική σειρά ελέγχου iPSC που διαφέρει από τη κυτταρική σειρά των iPSC iDMD μόνο στην περιοχή DMD, ελαχιστοποιώντας έτσι τις εγγενείς παραλλαγές μεταξύ των σειρών iPSC (Chemello et al., 2020).

Τα προερχόμενα από ασθενείς iPSCs και τα iDMD iPSCs που φέρουν απαλοιφές εξωνίων, αντιγραφές, σημειακές μεταλλάξεις ή ψευδοεξώνια επιδιορθώθηκαν με τη διαδικασία του 'myoediting' με σκοπό να αποκατασταθεί η δυστροφίνη. Για την αξιολόγηση της λειτουργίας της αποκατεστημένης δυστροφίνης στα μετασχηματισμένα πλέον iPSCs έχουν διεξαχθεί μεταβατικές δοκιμασίες ασβεστίου και δοκιμές συστολής καρδιακών μυών 3D. Αυτές οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινα κύτταρα είναι καθοριστικές για την ταυτοποίηση των sgRNAs που μπορούν να αποκτήσουν κλινική υπόσταση (Chemello et al., 2020).

Συμπερασματικά, η τεχνολογία γονιδιωματικής CRISPR έχει φέρει την επανάσταση στον πεδίο των μυϊκών δυστροφιών, προσφέροντας ελπίδα για θεραπεία (**Εικόνα 20**). Επιτυχημένες κλινικές δοκιμές του CRISPR ανοίγουν το δρόμο για τη μελλοντική εκτενή εφαρμογή του.



**Εικόνα 19 Αποτελέσματα της γονιδιοματικής από το CRISPR/Cas9 σε ασθενείς με DMD.** Ασθενείς με DMD με απαλοιφή του εξωνίου 50 στο γονίδιο *DMD* φέρουν μια μετάλλαξη εκτός πλαισίου. (i) Το "myoeediting" με διπλή θραύση έχει ως αποτέλεσμα την απαλοιφή ενός ή πολλών εξωνίων. (ii) Το "myoeediting" με sgRNA και μονή θραύση που έχει σχεδιαστεί με ακρίβεια σε θέσεις συρραφής [π.χ. θέση δέκτη συρραφής (splice acceptor site, SAS)] αποκαθιστά το σωστό ORF τόσο από γεγονότα παράκαμψης εξωνίου όσο και από γεγονότα αναδιαμόρφωσής τους. (iii) νουκλεοτιδική επεξεργασία μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω επεξεργασίας βάσεων (base editing, BE) ή μέσω πρωτεύουσας επεξεργασίας (prime editing, PE), επιδιορθώνοντας μεταλλάξεις που οδηγούν σε πρώιμα κωδικόνια λήξης. Τα εξόνια που κωδικοποιούν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης επισημαίνονται με μπλε χρώμα. Τα εξόνια με κωδικόνιο λήξης εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα. Το επιδιορθωμένο εξόνιο εμφανίζεται με πράσινο χρώμα. [Προσαρμογή από (Chemello et al., 2020)].



**Εικόνα 20** Επισκόπηση της επιδιόρθωσης του *DMD* μέσω του “myoeediting”. Το δείγμα συλλέγεται από ασθενείς με μυϊκή δυστροφία Duchenne (ή υγιή άτομα) για να γονοτυπηθεί στη συνέχεια και να παραχθούν DMD-iPSCs. Τα DMD-iPSC μεταγώνονται με την Cas9 και το sgRNA, και διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα για να αξιολογηθεί μετά η επεξεργασία μέσω της αποκατάστασης της δυστροφίνης. Το σύστημα παράδοσης AAV δημιουργείται χρησιμοποιώντας βελτιστοποιημένο sgRNA και Cas9, και χρησιμοποιείται για να μολύνει ποντίκια (για δοκιμές *in vivo* επεξεργασίας), σκύλους (για τη μεγέθυνση κλίμακας πειραματόζωων), ή και τελικά ανθρώπους (σαν θεραπευτική προσέγγιση) για την επιδιόρθωση του DMD [Προσαρμογή από (Chemello et al., 2020)].

### 3.1.6. Προοπτικές εφαρμογής του συστήματος CRISPR/Cas9 στη θεραπεία των καρδιαγγειακών παθήσεων

Το γονίδιο της προ-πρωτεϊνικής κονβερτάσης σουμπτιλισίνης/κεξίνης τύπου 9 (*PCSK9*) έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοίωσης της χοληστερόλης. Η μετάλλαξη απόκτησης λειτουργίας (gain-of-function) του γονιδίου *PCSK9* μπορεί να οδηγήσει σε υπερχοληστερολαιμία και αρτηριοσκλήρυνση. Έχει αναφερθεί θεραπευτική στόχευση του γονιδίου *PCSK9* σε ποντίκια μεσολαβούμενη από το σύστημα CRISPR/Cas9 (Sharma et al., 2021; To & Editor et al., 2017). Επιπλέον, όπως καταγράφηκε, η γονιδιοματική που ασκήθηκε από την τεχνολογία CRISPR επέφερε τη

διάρρηξη του γονιδίου του λιποπρωτεϊνικού υποδοχέα χαμηλής πυκνότητας (Low density lipoprotein receptor, *Ldlr*) και την υπερέκφραση του γονιδίου *PCSK9* σε ενήλικα ποντίκια στα πλαίσια έρευνας για την αθηροσκλήρωση. Παράλληλα, ασκήθηκε γονιδιωματική επεξεργασία μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 σε μοντέλο zebrafish για να διορθώσει τις ανθρώπινες γενετικές καρδιαγγειακές διαταραχές. Με βάση τα στοιχεία των μελετών αυτών, το σύστημα CRISPR/Cas9 θα μπορούσε να δράσει ως ένα πιθανό εργαλείο επεξεργασίας γονιδιώματος ενάντια στις καρδιαγγειακές διαταραχές, και ειδικά σε καταστάσεις που σχετίζονται με κληρονομικές διαταραχές λιπιδίων (Sharma et al., 2021).

### **3.1.7. Προοπτικές εφαρμογής του συστήματος CRISPR/Cas9 στη θεραπεία της κυστικής ίνωσης (Cystic Fibrosis, CF)**

Η κυστική ίνωση (CF) είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη μονογονιδιακή νόσος που προκαλείται μετά από μεταλλάξεις στο γονίδιο του ρυθμιστή διαμεμβρανικής αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, *CFTR*), προκαλώντας βλάβη στους πνεύμονες και το πεπτικό σύστημα.

Η προσέγγιση της νόσου με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 μπορεί να είναι μια κατάλληλη μέθοδος για την επιδιόρθωση μεταλλάξεων στο γονίδιο *CFTR*. Μάλιστα έχει καταγραφεί επιδιόρθωση της μετάλλαξης στο γονίδιο *CFTR* σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα με χρήση του CRISPR/Cas9 (Crane et al., 2015). Σε άλλη μελέτη, αναπτύχθηκαν μοντέλα προβάτων (*CFTR*<sup>-/-</sup> και *CFTR*<sup>+/-</sup>) μέσω της διάρρηξης του γονιδίου *CFTR* που προσφέρει το σύστημα CRISPR/Cas9. Η μελέτη είχε στόχο την κατανόηση της παθογένειας της νόσου (Fan et al., 2018). Σε άλλη περίπτωση, η τεχνολογία CRISPR/Cas9 χρησιμοποιήθηκε σε καλλιεργημένα βλαστοκύτταρα ασθενών με κυστική ίνωση για να επιδιορθώσει το μεταλλαγμένο *CFTR*. Σε πρωτογενή ενήλικα βλαστοκύτταρα η τροποποίηση του γονιδίου *CFTR* πραγματοποιήθηκε μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Schwank et al., 2013). Συνεπώς, η τεχνολογία CRISPR μπορεί να αποτελέσει μια πιθανή προσέγγιση για τη θεραπεία της κυστικής ίνωσης στο εγγύς μέλλον.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## 4.1. Προκλήσεις του συστήματος CRISPR-Cas9

Παρά την παγκόσμια πρόοδο που παρουσιάζουν η προκλινική εργασία και οι κλινικές δοκιμές που επικεντρώνονται σε θεραπείες ίασης, τα αποτελέσματα της γονιδιακής επιδιόρθωσης με τη μεσολάβηση του συστήματος CRISPR/Cas9 παραμένουν σε μεγάλο βαθμό απρόβλεπτα. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό επιτυχίας της γονιδιωματικής επεξεργασίας μέσω του συστήματος CRISPR/Cas αλλά και τα ερωτήματα που εγείρονται από τη χρήση του αναπτύσσονται ακολούθως.

### 4.1.1. Επιδράσεις της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 εκτός της περιοχής-στόχου (“off-target” effects)

Ένας από τους βασικότερους προβληματισμούς αναφορικά με το σύστημα CRISPR/Cas9 αποτελεί η δράση του εκτός των περιοχών-στόχων. Σύμφωνα με τα ευρήματα πολλών ερευνητών η τεχνολογία CRISPR προκαλεί συχνά ενθέσεις και απαλοιφές σε ανεπιθύμητες γονιδιωματικές περιοχές. Η συνεχόμενη γενετική τροποποίηση αυξάνει τον κίνδυνο θραύσης σε περιοχές εκτός των επιθυμητών και μειώνει την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας του γονιδιώματος (Cheng et al., 2020). Έχει παρατηρηθεί πως οι δράσεις εκτός περιοχής-στόχου κατευθύνονται κατά κύριο λόγο από τα RNA-οδηγούς, και γι’ αυτό και κρίνεται απαραίτητο, ο σχεδιασμός των τελευταίων να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να εξασφαλίζεται η βέλτιστη αποτελεσματικότητα της γονιδιωματικής επεξεργασίας μέσω CRISPR.

Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι οι επιδράσεις εκτός της περιοχής-στόχου ήταν συχνές σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων όπου παρατηρείται παρατεταμένη έκφραση της πρωτεΐνης Cas9, ενώ ήταν λιγότερο συχνές σε μοντέλα *in vivo*. Στις κυτταροκαλλιέργειες, διάφοροι παράγοντες συμβάλλουν στην εμφάνιση αυτού του φαινομένου. Σε αυτούς περιλαμβάνονται, ο τύπος του κυττάρου, το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου, η μέθοδος διαμόλυνσης, οι συνθήκες διατήρησης της κυτταροκαλλιέργειας, η συνεχής έκφραση της νουκλεάσης, η αλληλουχία-οδηγός και τα περιστατικά επιδιόρθωσης (Sharma et al., 2021).

#### **4.1.1.1 Τρόποι αντιμετώπισης των επιδράσεων εκτός των περιοχών-στόχων**

Μία από τις εναλλακτικές που έχει αναπτυχθεί για να μειώσει τη δράση του συστήματος εκτός των περιοχών-στόχων είναι η αλλαγή στις αλληλουχίες-οδηγούς. Συγκεκριμένα, αναφέρεται πως μπορεί να μειωθεί το μήκος του RNA-οδηγού (αποκτώντας πλέον την ονομασία κολοβωμένο RNA, truncated guide RNA, trugRNA), να προστεθούν επιπλέον νουκλεοτίδια στο 5' άκρο της αλληλουχίας-οδηγού, ή ακόμη να βελτιωθεί η δομή του. Με τις μεθόδους αυτές έχει καταγραφεί αυξημένη εξειδίκευση και μειωμένη ανεπιθύμητη μεταλλαξιγένεση σε περιοχές εκτός αυτών που στοχεύονται.

Παράλληλα, άλλος τρόπος που προτείνεται είναι η αξιοποίηση των νικασών. Πρόκειται για μεταλλαγμένες εκδοχές της Cas9 οι οποίες έχουν αλλαγμένο τον ένα καταλυτικό τους τομέα, κόβουν μόνο τον ένα κλώνο και επομένως πρέπει να χρησιμοποιούνται σε ζεύγη. Η στρατηγική αυτή αποδείχθηκε πως σχεδόν εξάλειψε τις επιδράσεις εκτός των περιοχών-στόχων, ενώ δεν επηρέασε αρνητικά τη θραύση της επιθυμητής περιοχής.

Τέλος, σημαντική είναι και η ρύθμιση της ποσότητας των στοιχείων που απαρτίζουν την τεχνολογία CRISPR. Ορισμένες από τις επιδράσεις εκτός των περιοχών-στόχων αποδίδονται στην υψηλή συγκέντρωση των συστατικών του συστήματος που χρησιμοποιούνται. Μία βελτιστοποίηση επομένως της διαδικασίας με τη χρήση των σωστών ποσοτήτων των συστατικών στοιχείων CRISPR κάτω από συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα θα συνέβαλλε στην επίλυση του ζητήματος αυτού (Torres-Ruiz & Rodriguez-Perales, 2017).

#### **4.1.2. Επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων**

Αν και η τεχνολογία CRISPR/Cas9 μπορεί να επάγει επιθυμητές αλλαγές στις γονιδιωματικές αλληλουχίες, ο μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA που δεν είναι απόλυτα ελεγχόμενος και δεν έχει κατανοηθεί πλήρως σχετίζεται με τον ανεπιθύμητο κίνδυνο βιολογικών δυσλειτουργιών. Η μη επιθυμητή ένθεση αλληλουχίας DNA-δότη στη θέση της ενσωμάτωσης και η αναστροφή αποτελούν επίσης απρόβλεπτες συνέπειες των



μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, που μπορεί να οδηγήσουν σε απροσδόκητες μεταλλάξεις.

Όπως έχει προαναφερθεί οι δίκλωνες θραύσεις (DSBs) επιδιορθώνονται μέσω των μονοπατιών της μη ομόλογης σύνδεσης ελεύθερων άκρων (NHEJ) και του εξαρτώμενου από την ομολογία μηχανισμού επιδιόρθωσης (HDR) (βλέπε § 1.1.1.2.1). Το NHEJ είναι ένα μηχανισμός επιρρεπής σε σφάλματα που πιθανώς οδηγεί σε μεταλλάξεις. Αντίθετα, το HDR μονοπάτι, αν και επισκευάζει τις δίκλωνες θραύσεις με μεγαλύτερη ακρίβεια, εμφανίζεται με πολύ χαμηλότερη συχνότητα σε σύγκριση με το NHEJ (Sharma et al., 2021). Συγκεκριμένα, ασκώντας γονιδιωματική επεξεργασία βασισμένη στην πρωτεΐνη Cas9 σε ποντίκια καταγράφηκε αποτελεσματικότητα επιδιόρθωσης HDR σε ποσοστό 0.5-20%, ενώ η επιδιόρθωση μέσω του μονοπατιού NHEJ συνέβη σε ποσοστό 20-60% (Lino et al., 2018).

Διάφορες μέθοδοι προτείνονται για την καταστολή του μονοπατιού NHEJ, όπως η χημική καταστολή του χρησιμοποιώντας μικρούς μοριακούς αναστολείς, ο συγχρονισμός του κυτταρικού κύκλου, η γονιδιακή αποσιώπηση και οι κυτταρικές γραμμές που στερούνται συστατικών στοιχείων του μονοπατιού NHEJ (Sharma et al., 2021). Ο αναστολέας Scf7 για παράδειγμα, που στοχεύει στο συστατικό στοιχείο DNA λιγάση IV του μηχανισμού NHEJ, έχει αναφερθεί ότι αυξάνει την αποτελεσματικότητα της HDR επιδιόρθωσης μετά από τη γονιδιωματική επεξεργασία έως και 19 φορές. Τέτοιου είδους αναστολείς παρά το θετικό τους αντίκτυπο, ενδέχεται να έχουν τοξικές επιδράσεις στα κύτταρα-ξενιστές. Επιπλέον, ο συγχρονισμός των κυττάρων στη φάση S και G2, όπου μπορεί να λάβει χώρα ο εξαρτώμενος από την ομολογία ανασυνδυασμός, μαζί με την άμεση μεταφορά του συμπλόκου ριβονουκλεάσης-Cas9 στον κυτταρικό πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, μπορεί να αποδειχθούν ως μια βιώσιμη εναλλακτική λύση στη χημική καταστολή του μονοπατιού NHEJ (Lino et al., 2018).

Πέρα από την καταστολή του μονοπατιού προτείνεται αντίστοιχα η ενίσχυση του μονοπατιού HDR. Συνήθως, τα πρότυπα που χρησιμοποιεί ο εξαρτώμενος από την αλληλουχία ανασυνδυασμός είναι είτε μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια είτε πλασμίδια που περιέχουν αλληλόμορφα δίπλα σε θέσεις-στόχους.

Τόσο ιικοί όσο και μη ιικοί φορείς έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς στην παράδοση του προτύπου HDR. Θεωρητικά, παράδοση του προτύπου HDR που βασίζεται σε νανοφορέα περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα: σχηματισμός του συμπλόκου νανοφορέα-εκμαγείου HDR με ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση, μεγιστοποίηση της πρόσληψης από το κύτταρο,

αποτροπή της αποικοδόμησης και μετατόπιση στον κυτταρικό πυρήνα. Αυτός ο τρόπος παράδοσης ομοιάζει με την παράδοση μέσω ολιγονουκλεοτιδίων ή πλασμιδιακού DNA. Φυσικά, αυτά τα κριτήρια είναι ανάλογα της παράδοσης του πλασμιδίου/πρωτεΐνης Cas9 και των sgRNAs. Επομένως, για να αυξήσουμε την αποδοτικότητα του HDR, μπορούμε να συνδυάσουμε τους νανοφορείς που χρησιμοποιούνται για τα πρότυπα HDR με το πλασμίδιο/πρωτεΐνη Cas9 ή sgRNA, ώστε να προωθήσουμε την από κοινού παράδοση των συστατικών στοιχείων της Cas9/sgRNA και των πρότυπων HDR (Cheng et al., 2020). Συνεπώς, ενίσχυση της αποτελεσματικότητας του μονοπατιού HDR μέσω ταυτόχρονης μείωσης αυτής του NHEJ είναι μια κρίσιμη πρόκληση που πρέπει να διερευνηθεί πλήρως πριν από την είσοδο σε θεραπευτικούς φορείς προκειμένου να εξασφαλιστεί το επιθυμητό αποτέλεσμα γονιδιωματικής επεξεργασίας με τη μεσολάβηση του συστήματος CRISPR/Cas9 (Sharma et al., 2021).

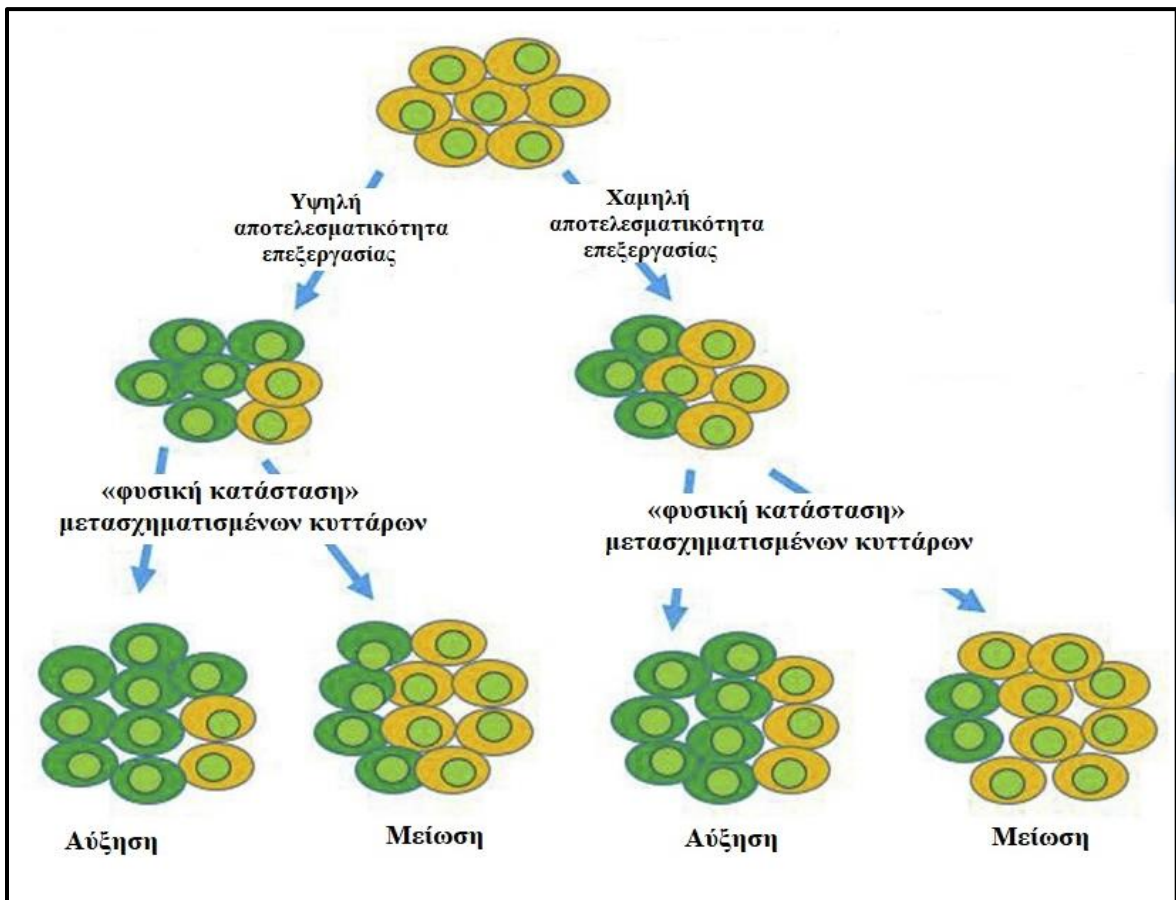
#### **4.1.3. Φυσική κατάσταση των μετασηματισμένων κυττάρων**

Η τρίτη πρόκληση είναι η καταλληλότητα των επεξεργασμένων κυττάρων (**Εικόνα 21**). Αν τα επεξεργασμένα κύτταρα έχουν καλύτερη ικανότητα πολλαπλασιασμού ή παρουσιάζουν μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα από τα μη επεξεργασμένα κύτταρα, αυτό θα διευκολύνει το επεξεργασμένο «προϊόν» να φτάσει το θεραπευτικό κατώφλι που απαιτείται για επιτυχημένα θεραπευτικά αποτελέσματα. Αντίθετα, αν τα μετασηματισμένα κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλή αποτελεσματικότητα επεξεργασίας ή στερούνται προσαρμοστικότητας σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα κύτταρα, το θεραπευτικό αποτέλεσμα δεν θα είναι το αναμενόμενο. Ο περιορισμός αυτός μπορεί εν μέρει να ξεπεραστεί μέσω της γονιδιωματικής επεξεργασίας *in vitro* και τα επεξεργασμένα κύτταρα μπορούν να εγχυθούν ξανά πίσω στους ασθενείς αφού έχουν αναπτυχθεί σε επαρκή αριθμό (Cheng et al., 2020).

#### **4.1.4. Παράδοση των στοιχείων του συστήματος**

Αν και έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για την παράδοση των συστατικών στοιχείων της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 στα κύτταρα (βλέπε **Κεφάλαιο 3**), η παράδοση παραμένει εμπόδιο στην ευρεία χρήση του CRISPR ως θεραπευτικού παράγοντα.

Ο όρος επιτυχημένη γονιδιωματική στόχευση περιλαμβάνει τρεις συνιστώσες: 1) την επιτυχή διαμόλυνση μέσα στα κύτταρα, 2) την ελάχιστη δυνατή τοξικότητα προκαλούμενη από τη μέθοδο παράδοσης, 3) την ταχεία εκκαθάριση των στοιχείων παράδοσης μετά τη θεραπεία. Το να επιτευχθούν όλα αυτά ταυτόχρονα χρησιμοποιώντας τις μέχρι τώρα επιλογές αποτελεί πρόκληση (M. Chen et al., 2019; Randhawa & Sengar, 2021).



**Εικόνα 21 «Φυσική κατάσταση» των μετασχηματισμένων κυττάρων και αποτελεσματικότητα επεξεργασίας.** Σε περιπτώσεις υψηλής απόδοσης γονιδιωματικής επεξεργασίας, ο αριθμός των κυτταρικών πληθυσμών που φέρουν τις επιθυμητές γονιδιωματικές τροποποιήσεις παρουσιάζεται αυξημένος. Ανάλογα, σε περιπτώσεις χαμηλής απόδοσης γονιδιωματικής επεξεργασίας, η απόδοση επεξεργασίας είναι χαμηλή και ο αριθμός των μετασχηματισμένων κυττάρων παρουσιάζεται πιο χαμηλός. Σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα κύτταρα, τα επεξεργασμένα συνήθως μειονεκτούν αναφορικά με τη «φυσική κατάστασή» τους, με αποτέλεσμα να έχουν χαμηλότερα θεραπευτικά οφέλη. Αντιστρόφως, εάν τα επεξεργασμένα κύτταρα έχουν αυξημένη ευελιξία έναντι των μη επεξεργασμένων κυττάρων, αποκτούν επιλεκτικό πλεονέκτημα και έτσι ο αριθμός των κυττάρων που πρέπει να υποστούν επεξεργασία αρχικά για την καταπολέμηση της εκάστοτε νόσου θα μειωθεί [Προσαρμογή από (Chen et al., 2019)].

Οι ιικοί φορείς θεωρούνται πολλά υποσχόμενοι για δύο κυρίως λόγους: 1) ο καθορισμένος τροπισμός τους μπορεί να στοχευθεί ξανά μέσα από σχεδόν κάθε ιστό και κυτταρικό τύπο, 2) μπορούν να χορηγηθούν τοπικά ή συστηματικά ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε ασθενή. Αποτελούν δηλαδή ένα ευέλικτο εργαλείο που βρίσκει ευρεία εφαρμογή, χωρίς αυτό να σημαίνει πως δεν συνοδεύονται και από προβλήματα (βλέπε § 3.2.) (Torres-Ruiz & Rodriguez-Perales, 2017).

Από τους μη ιικούς φορείς η μικροέγχυση έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την παράδοση του συμπλόκου RNP σε εμβρυικά κύτταρα ζώων ενώ και άλλοι μη ιικοί φορείς επιφέρουν εξαιρετικά *in vitro* αποτελέσματα. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει ακόμη τεχνική που να επιτρέπει την απευθείας επεξεργασία των σωματικών κυττάρων και έτσι το «ταξίδι» του συστήματος CRISPR προς την κλινική πράξη δε μπορεί να ολοκληρωθεί (Randhawa & Sengar, 2021).

## 4.2 Ηθικοί προβληματισμοί

Με την ανακάλυψη του συστήματος CRISPR/Cas9 καθίσταται πλέον δυνατή οι τροποποίηση τόσο σωματικών όσο και γεννητικών κυτταρικών σειρών. Το 2015, έγινε γνωστή η προσπάθεια μιας ομάδας Κινέζων επιστημόνων να εξαλείψουν το γονίδιο HBB της ανθρώπινης β-σφαιρίνης από τα γαμετικά κύτταρα εφαρμόζοντας γονιδιοματική επεξεργασία μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 σε ανθρώπινο ζυγωτό (Krishan et al., 2016). Την επόμενη χρονιά, επιστήμονες από τη Δανία απέτυχαν στην εφαρμογή της τεχνολογίας CRISPR σε υγιή έμβρυα. Το 2017, Κινέζοι επιστήμονες επιδιόρθωσαν μία σημειακή μετάλλαξη με τη βοήθεια του συστήματος CRISPR, και έτσι επιτεύχθηκε η εξ' ολοκλήρου επιδιόρθωση των σημειακών μεταλλάξεων σε ορισμένα από τα έμβρυα. Οι μελέτες αυτές προκάλεσαν ηθικές και κοινωνικές ανησυχίες για τις πιθανές συνέπειες από την εφαρμογή της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 στα γεννητικά κύτταρα (Mintz et al., 2019).

Η τροποποίηση των κυττάρων της γαμετικής σειράς διαφέρει από εκείνη των σωματικών κυττάρων. Η πρώτη εισάγει γενετικές αλλαγές στα κύτταρα που ευθύνονται για την αύξηση των αναπαραγωγικών κυττάρων ενός ανθρώπου. Αντίθετα, η τροποποίηση των σωματικών κυττάρων από την άλλη, εισάγει γενετικές αλλαγές σε όλα τα είδη κυττάρων ενός ανθρώπου, εκτός από τα αναπαραγωγικά. Το αποτέλεσμα της τροποποίησης των κυττάρων της γαμετικής σειράς είναι πως τα τροποποιημένα γονίδια

μεταβιβάζονται στους απογόνους του ανθρώπου κάτι το οποίο δεν παρατηρείται με την τροποποίηση των σωματικών κυττάρων (Mintz et al., 2019).

Το ανθρώπινο έμβρυο έχει αδιαμφισβήτητα ανεκτίμητη αξία, η οποία ανάλογα με την κοινωνία και το θρήσκευμα μπορεί να αποκτά διαφορετική υπόσταση, θέτοντας σε κάθε περίπτωση περιορισμούς ως προς την επεξεργασία του. Η απομόνωση για παράδειγμα ανθρώπινων εμβρυικών βλαστικών κυττάρων (hESCs) από ανθρώπινα έμβρυα θεωρείται από πολλούς ανθρώπους ανήθικη και αμφισβητήσιμη αφού προϋποθέτει την «αποικοδόμηση» του εμβρύου. Γι' αυτό και η έρευνα πάνω στα hESCs έχει απαγορευτεί σε πολλές χώρες του κόσμου. Βέβαια, οι διεθνείς νόμοι για τη χρήση των hESCs δεν έχουν ενοποιηθεί σε παγκόσμιο επίπεδο. Έτσι, μεταξύ των Ευρωπαϊκών χωρών, οι νόμοι για την έρευνα πάνω στα hESCs διαφέρουν σημαντικά. Πιο αυστηροί παρουσιάζονται σε χώρες όπως η Γερμανία, η Αυστρία και η Κροατία, ενώ σε χώρες όπως η Ελλάδα και η Σουηδία το κλίμα είναι πιο υποστηρικτικό. Γενικά σε πολλές χώρες βρίσκεται σε εξέλιξη διαρκής συζήτηση σχετικά με την παρούσα νομοθεσία και κατά πόσο αυτή θα πρέπει να τροποποιηθεί (Hirsch et al., 2019).

Οι λόγοι οι οποίοι εγείρουν ανησυχία ως προς την εφαρμοσιμότητα της τεχνολογίας CRISPR στα γαμετικά κύτταρα αφορούν τόσο ζητήματα ασφάλειας όσο και ηθικά. Πιο συγκεκριμένα, δεν υπάρχουν ακόμη οι απαραίτητες εγγυήσεις σχετικά με την ασφάλεια της μεθόδου, και έτσι αυτή συνοδεύεται από απρόβλεπτες για το γονιδίωμα συνέπειες, οι οποίες δεν ξέρουμε πόσο επιζήμιες μπορεί να είναι για τον προς τροποποίηση οργανισμό. Επιπλέον, αν και επαναστατική, πρόκειται για μια άκρως επεμβατική μέθοδο. Γεννώνται εύλογα ερωτήματα για το πόσο ηθικά αποδεκτή είναι η επέμβαση στο ανθρώπινο γονιδίωμα, το οποίο και αποτελεί την βιολογική ταυτότητα των ατόμων και προσδίδει τη γενετική ποικιλομορφία στο ανθρώπινο είδος.

Η εφαρμογή στα γαμετικά κύτταρα είναι ιδιαίτερος προβληματική αφού όπως προαναφέρθηκε οι γενετικές αλλαγές μεταφέρονται και στους απογόνους, επηρεάζοντας τις μελλοντικές γενεές. Τίθενται θέματα αυτονομίας και συναίνεσης αφού δε δίνεται η δυνατότητα επιλογής, καταπατώντας έτσι την ανθρώπινη ελευθερία. Από ηθικής άποψης δεν είναι σε θέση ούτε οι ίδιοι γονείς να πάρουν μια τέτοια απόφαση για το αγέννητο παιδί τους. Ακόμη και όταν πρόκειται για τη πρόληψη εμφάνισης ασθενειών στο έμβρυο, και επακολούθως στους απογόνους, δεν μπορούμε να καταστήσουμε υπεύθυνοι επιλογής, αφού τόσο οι μηχανισμοί του ανθρώπινου οργανισμού όσο και επίσης ο τρόπος δράσης της τεχνολογίας CRISPR είναι μερικώς γνωστοί.

Παράλληλα, ο τρόπος διάθεσης των μεθόδων αυτών στο κοινωνικό σύνολο ενδεχομένως να προκαλέσει κοινωνικές διακρίσεις. Αν δηλαδή επωφελούνται μόνο οι ανώτερες κοινωνικές τάξεις, ελλοχεύει ο κίνδυνος να γίνει αλόγιστη χρήση της τεχνολογίας για την τροποποίηση εμβρύων σε μια προσπάθεια εξιδανίκευσης του ανθρώπινου είδους. Κάτι τέτοιο θα λειτουργούσε εις βάρος του κοινωνικού συνόλου, θέτοντας τις βάσεις για το ρατσισμό εις βάρος των μη γενετικά τροποποιημένων εμβρύων και άρα βιολογικά «αδύναμων».

Τέλος, η τεράστια δύναμη που φέρει πάνω στο γονιδίωμα η συγκεκριμένη τεχνολογία σε συνδυασμό με την άπληστη φύση του ανθρώπου μπορεί να συμβάλει στην επικράτηση των “CRISPR babies, δημιουργώντας ένα ιδεατό ανθρώπινο είδος με ενισχυμένες ικανότητες (όπως η ευφυΐα) και βελτιωμένη εξωτερική εμφάνιση.

Με βάση όσα ειπώθηκαν είναι ζωτικής σημασίας να ξεπεραστούν τα ηθικά διλήμματα ζυγίζοντας τα θετικά και αρνητικά της ανερχόμενης τεχνολογίας CRISPR και αναζητώντας τρόπους προσαρμογής της ώστε να εξασφαλιστεί ότι η δράση της δεν θα είναι επιζήμια για το ανθρώπινο είδος. Επιπρόσθετα, είναι απαραίτητο να γίνουν εποικοδομητικές συζητήσεις μεταξύ επιστημόνων ανά τον κόσμο, ώστε να τεθούν κοινές βάσεις για τον τρόπο χειρισμού της μεθόδου και να οριστεί ενιαία νομοθεσία για την εφαρμογή της.

#### **4.3. Μελλοντικές προοπτικές**

Αδιαμφισβήτητα η τεχνολογία CRISPR/Cas9 έχει επιφέρει επανάσταση στις Βιοϊατρικές Επιστήμες και θεωρείται ένα από τα πιο ταχέως αναπτυσσόμενα συστήματα γονιδιωματικής επεξεργασίας, καθώς καθιστά δυνατή τη γονιδιωματική τροποποίηση σε πληθώρα κυττάρων και οργανισμών. Ταυτόχρονα, υπερέχει των νουκλεασών που ανακαλύφθηκαν πριν από αυτή, εξαιτίας της απλότητας του σχεδιασμού της, της υψηλής αποτελεσματικότητας της, του χαμηλού της κόστους και της χαμηλότερης συγκριτικά κυτταροτοξικότητας που τη χαρακτηρίζουν.

Το θετικό κυρίως πρόσημο που φέρει δε σημαίνει πως ένα τέτοιο σύστημα μπορεί να εφαρμοστεί καθολικά και χωρίς να υπάρχουν περιορισμοί. Πολλά είναι τα ερωτήματα που προκύπτουν για μία τόσο επεμβατική για το γονιδίωμα μέθοδο.

Αρχικά, θα πρέπει να αναλογιστούμε για ποιες ασθένειες είναι περισσότερο πιθανό να δράσει θεραπευτικά. Αναλογιζόμενοι το μηχανισμό δράσης του συστήματος, θα ήταν προτιμότερο να επικεντρωθούμε σε μονογονιδιακές ασθένειες. Στις περιπτώσεις τέτοιων γενετικών διαταραχών, όπως είναι για παράδειγμα η κυστική ίνωση, η δρεπανοκυτταρική νόσος και η μυοτονική δυστροφία, οι ασθενείς δεν παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς τις μεταλλάξεις και επίσης ένα γονίδιο είναι πιο εύκολο να στοχευθεί με την επιθυμητή εξειδίκευση και ευαισθησία. Η εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9 σε πολυπαραγοντικές ασθένειες όπως ο καρκίνος ενέχει μεγαλύτερο ρίσκο και καθιστά το έργο σχεδιασμού του RNA-οδηγού δυσκολότερο. Ταυτόχρονα, πέραν του γενετικού υποβάθρου κατάλληλες για εφαρμογή της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 θα ήταν ασθένειες για τις οποίες μέχρι σήμερα δεν υπάρχει διαθέσιμη θεραπεία ή που το κόστος της διαθέσιμης θεραπείας τους είναι αρκετά υψηλό επιβαρύνοντας τον ασθενή οικονομικά αλλά και ψυχολογικά.

Εν συνεχεία, σε περίπτωση έγκρισης της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 στο μέλλον, οφείλουμε να αναλογιστούμε πώς θα έπρεπε να ελέγχεται η τρόπος χρήσης της; Επιπλέον ερωτήματα προκύπτουν σχετικά με τον τρόπο εξασφάλισης της συνετής χρήσης της, καθώς και φυσικά τα κριτήρια για την εφαρμογή της. Σίγουρα η σύσταση επιτροπών, μέλη των οποίων θα είναι άτομα της επιστημονικής κοινότητας, είναι απαραίτητη και θα θέσει τις βασικές αρχές όσον αφορά τον τρόπο με τον οποίο θα χορηγείται μια τόσο επαναστατική μέθοδος γονιδιωματικής επεξεργασίας. Θα πρέπει να θεσμοθετηθούν κριτήρια όπως για παράδειγμα η ηλικία, η ποιότητα ζωής, το ιατρικό ιστορικό, σύμφωνα με τα οποία κανείς θα είναι σε θέση να λάβει θεραπεία. Επίσης, καλό θα ήταν να διασφαλιστεί ότι τέτοιες πρακτικές λαμβάνουν χώρα σε εξειδικευμένους χώρους και από επιστήμονες του χώρου της υγείας. Θα πρέπει να τεθούν σαφή όρια για το εύρος εφαρμογής της μεθόδου, να υπάρξει πολύ αυστηρή επίβλεψη του τρόπου χρήσης της και ενδεχομένως η χορήγηση προστίμων και ποινών σε περιπτώσεις παραβίασης και αλόγιστης χρήσης.

Ταυτόχρονα, πρέπει να λάβουμε υπόψιν τις συνέπειες που θα έχει η έγκριση της άσκησης γονιδιωματικής επεξεργασίας μέσω του συστήματος CRISPR/Ca9 σε έμβρυα. Παραμονεύει ο κίνδυνος για κοινωνικές διακρίσεις μεταξύ γενετικά τροποποιημένων και μη εμβρύων μέσω της ανάπτυξης ενός ιδεατού ανθρώπινου μοντέλου. Το να προβούμε σε εξάλειψη γενετικών προδιαθέσεων συνεπάγεται και την άρση της γενετικής ποικιλομορφία που χαρακτηρίζει το ανθρώπινο είδος. Γι' αυτό και κρίνεται απαραίτητο η χρήση τέτοιων

τεχνολογιών να επικεντρώνεται στη θεραπεία και όχι στη βελτίωση. Να έχουμε δηλαδή ως γνώμονα την αποκατάσταση των φυσιολογικών λειτουργιών και όχι τη βελτίωση χαρακτηριστικών που ανήκουν στο φάσμα του φυσιολογικού.

Με τις κατάλληλες επομένως ρυθμίσεις, το σύστημα CRIPSR/Cas9 αποτελεί πανίσχυρο όπλο στα χέρια των ειδικών προσφέροντας ελπίδα για τη θεραπευτική νόσων με ακρίβεια και αποτελεσματικότητα, μεταμορφώνοντας έτσι τη ζωή πολλών ανθρώπων.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Κάνοντας μια ανασκόπηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, μπορούμε να συμπεράνουμε πως αν και η έννοια της γονιδιωματικής επεξεργασίας υφίσταται από την αρχή σχεδόν της ανακάλυψης του κεντρικού δόγματος της Βιολογίας, με την ανακάλυψη του συστήματος CRISPR/Cas9 αυτή απέκτησε νέα υπόσταση. Άνοιξε ένας καινούριος δρόμος για πιο αποτελεσματική και ακριβή γονιδιωματική. Ειδικότερα, το ένζυμο Cas9, με την ικανότητα που έχει να ανιχνεύει και να τροποποιεί οποιοδήποτε ξένο νουκλεϊκό οξύ, προσέελκυσε το ενδιαφέρον σε τομείς όπως η Βιοτεχνολογία για ευρεία χρήση.

Η εκτεταμένη μελέτη του συστήματος από ομάδες ερευνητών συνοψίζει το μηχανισμό δράσης του σε τρία βήματα, αυτά της ενσωμάτωσης, της έκφρασης και ωρίμανσης, και της παρεμβολής. Γνωρίζοντας έτσι τον τρόπο με τον οποίο ασκεί την επιρροή του στα κύτταρα διαθέτουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα για το πώς μπορεί να συνδράμει στη θεραπευτική ανθρωπίνων νόσων.

Καίριο σημείο για την ευόδωση της γονιδιωματικής επεξεργασίας με το σύστημα CRISPR αποτελεί ο τρόπος παράδοσης των συστατικών στοιχείων του. Οι τρόποι παράδοσης περιλαμβάνουν τους ικούς φορείς (αδενο-σχετιζόμενοι ιοί, λεντοϊοί και αδενοϊοί) και τους μη ικούς φορείς (που χωρίζονται αντίστοιχα σε χημικές και φυσικές μεθόδους). Ανάμεσα στις δύο αυτές μεγάλες κατηγορίες οι μη ικοί φορείς είναι μια αισθητά πιο ασφαλής επιλογή, αφού δε συνδέονται με ανεπιθύμητες επιδράσεις στα κύτταρα όπου εισάγονται. Από τους ικούς φορείς, οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί φαίνεται πως παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον και αναμένεται να επικρατήσουν ως φορείς εκλογής για την παράδοση της τεχνολογίας CRISPR. Τέλος, ένας εναλλακτικός φορέας παράδοσης, τα εξωκυτταρικά κυστίδια συνδυάζουν τα θετικά στοιχεία των ικών και μη ικών φορέων όντας πολλά υποσχόμενη μέθοδος.

Όσον αφορά την εφαρμογή στη θεραπευτική ανθρωπίνων νόσων, υπάρχουν πολλές ασθένειες οι οποίες έχουν τεθεί στο «μικροσκόπιο» και διερευνάται η καταλληλότητα του συστήματος CRISPR/Cas9 για τη θεραπεία τους. Ξεκινώντας με τον ιό HIV που εδώ και τόσα χρόνια προσβάλλει ανθρώπους ανά τον κόσμο, έχουν αναπτυχθεί διάφορες στρατηγικές χρήσης της τεχνολογίας CRISPR με τρόπο που είτε να παρεμποδίζουν τη μόλυνση από τον ιό, την ενσωμάτωσή του, ή την αντιγραφή του σε περίπτωση ενσωμάτωσης, είτε στοχεύοντας κύτταρα υπό λανθάνουσα μόλυνση. Και οι τέσσερις αυτές στρατηγικές παρουσιάζουν θετικά ευρήματα πειραματικά όμως απαιτούνται περαιτέρω κλινικές μελέτες και σε μοντέλα πρωτεύοντων ζώων. Εκτός από τον ιό επίκτητης ανοσοανεπάρκειας, ασθένειες όπως ο καρκίνος, οι αιματολογικές διαταραχές, οι μυϊκές

δυστροφίες, οι καρδιαγγειακές διαταραχές και η κυστική ίνωση έχουν μελετηθεί και έχουν διεξαχθεί πειράματα που, έχοντας ως βάση το σύστημα CRISPR/Cas9, επιδιώκουν να τροποποιήσουν το γονιδίωμα και να τις καταπολεμήσουν. Για καθεμία από τις νόσους τα ευρήματα των πειραμάτων είναι ελπιδοφόρα και υποδεικνύουν την επιτυχή εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9 για τη θεραπεία τους. Βεβαία, ακόμη οι επιστήμονες πραγματοποιούν μελέτες σε πειραματικό στάδιο και σε προκλινικό επίπεδο.

Παρά την επανάσταση που φαίνεται πως έχει φέρει το σύστημα CRISPR/Cas9, δεν παύει να συνοδεύεται και από προκλήσεις που χρήζουν διερεύνησης και αντιμετώπισης. Ο περιορισμός των επιδράσεων εκτός των περιοχών-στόχων μαζί με την ανάπτυξη νέων βελτιστοποιημένων μεθόδων παράδοσης των συστατικών στοιχείων της είναι καίριας σημασίας. Η εξασφάλιση τόσο υψηλής αποτελεσματικότητας όσο και υψηλής εξειδίκευσης θα συνδράμει εξίσου θετικά. Ουσιαστικά αυτό που χρειάζεται είναι περαιτέρω έρευνα για να μπορέσει το σύστημα CRISPR/Cas9 να χρησιμοποιηθεί στο εγγύς μέλλον θεραπευτικά χωρίς προβληματισμούς και δευτερες σκέψεις για την ασφάλειά του.

Εκτός από τα παραπάνω πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψιν και το κομμάτι της Βιοηθικής. Να διασφαλιστεί δηλαδή πως ο δρόμος προς την επιδιόρθωση του γονιδιώματος είναι όντως επωφελής για τους νοσούντες και πως δε θα χρησιμοποιείται αλόγιστα καταπατώντας την ανθρώπινη ελευθερία. Να τεθούν σαφή όρια ως προς τη χρήση του, ώστε μια πιθανή έγκριση εφαρμογής της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 στο ανθρώπινο γονιδίωμα για την επεξεργασία όχι μόνο σωματικών αλλά και γαμετικών κυττάρων να μην αποτελέσει την απαρχή για δημιουργία γενετικά τροποποιημένων όχι μόνο ανθρώπων αλλά και εμβρύων.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**



Το σύστημα CRISPR/Cas9 αποτελεί την πλέον ανερχόμενη μέθοδο γονιδιοματικής επεξεργασίας, υπερέχοντας των προηγούμενων μεθόδων που περιελάμβαναν άλλες προγραμματισμένες νουκλεάσες. Οι «περίεργες» αυτές αλληλουχίες CRISPR ανακαλύφθηκαν σε βακτήρια και Αρχαία και, όπως διαπιστώθηκε, αποτελούν έναν πλέον καλά χαρακτηρισμένο προσαρμοστικό αμυντικό μηχανισμό ενάντια στους φάγους. Τα δύο βασικά συστατικά της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 είναι η πρωτεΐνη Cas9 με τους τομείς ενδονουκλεάσης RuvC και HNH, και το RNA-οδηγός μονού κλώνου (sgRNA). Τα δύο αυτά μόρια δρώντας συνεργατικά προκαλούν δίκλωνες θραύσεις στο επιθυμητό τμήμα του DNA που χρήζει επιδιόρθωσης, ενώ οι τομείς ενδονουκλεάσης της Cas9 αφήνουν κομμένα τυφλά άκρα. Τα μονοπάτια HDR ή NHEJ του κυττάρου ενεργοποιούνται στη συνέχεια για την κάλυψη του κενού οδηγώντας σε ποικίλα αποτελέσματα. Για την παράδοση της Cas9 και του sgRNA στα κύτταρα εφαρμόζονται μέθοδοι που χρησιμοποιούν φορείς ιικού ή μη τύπου, με τους δεύτερους να διαχωρίζονται περαιτέρω σε φυσικούς ή χημικούς.

Η διαιώνιση ασθενειών με υπόβαθρο κατάλληλο για γονιδιοματική επεξεργασία μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 προκάλεσε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και έτσι διεξήχθησαν προκλινικές μελέτες για τη διερεύνηση της θεραπευτικής προοπτικής της τεχνολογίας αυτής. Στο επίκεντρο των ερευνών τέθηκαν νόσοι όπως ιικές λοιμώξεις, με κυριότερο λοιμογόνο παράγοντα τον ιό ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας HIV, διάφορες μορφές καρκίνου, αιματολογικές διαταραχές, μυϊκές δυστροφίες, καρδιαγγειακές διαταραχές και η κυστική ίνωση, με τα ευρήματά τους ως προς την αποτελεσματική θεραπεία να είναι θετικά. Μάλιστα, ασθένειες κατά τις οποίες όλοι οι νοσούντες φέρουν την ίδια γενετική μετάλλαξη, όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία, αποτελούν ιδανικούς υποψήφιους για θεραπευτική εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9. Για την αντιμετώπιση των προαναφερόμενων νόσων στην παρούσα μελέτη προτείνονται ποικίλοι τρόποι δράσης του συστήματος CRISPR/Cas9. Παράλληλα επισημαίνεται ότι, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή τόσο κατά την επιλογή του τρόπου παράδοσης των συστατικών στοιχείων της τεχνολογίας, όσο και κατά το σχεδιασμό των εκάστοτε RNA-οδηγών ώστε να περιορίζεται η δραστηριότητα εκτός της περιοχής-στόχου.



## **ABSTRACT**





The CRISPR/Cas9 system is the most up-to-date genome editing method surpassing other programmable nucleases. The so-called "weird" CRISPR sequences were discovered in bacteria and Archaea, and are now a well-understood adaptive anti-phage defense mechanism. The two main components of the CRISPR/Cas9 technology are the Cas9 protein with its RuvC and HNH endonuclease domains and the single stranded guide RNA (sgRNA). These two molecules, acting collaboratively, cause double-strand breaks in the desired part of DNA to be repaired, while the Cas9 endonuclease domains leave blunt ends behind. The cell's HDR or NHEJ pathways are then activated to fill the gap, leading to various results. Methods employing viral or non-viral vectors are applied for the delivery of Cas9 and sgRNA to the cells, with the non-viral ones being further classified as physical or chemical.

The perpetuation of diseases being appropriate for genome editing by use of the CRISPR/Cas9 system aroused the interest of the scientific community, and thus preclinical studies to investigate the therapeutic perspective of this technology took place. Research was focused on diseases such as viral infections, where the main infectious agent is the human immunodeficiency virus HIV, various cancer types, hematological disorders, muscular dystrophies, cardiovascular disorders and cystic fibrosis. The results of the research focusing on effective gene editing were promising. In fact, diseases in which patients carry the same genetic mutation, such as sickle cell disease, are considered to be perfect candidates for therapeutic application of the CRISPR/Cas9 system. In the present study, several ways for the CRISPR/Cas9 system to act are proposed regarding the treatment of the aforementioned diseases. Moreover, it is pointed out that in almost all cases much care is needed when choosing the delivery method of the CRISPR components, as well as when designing the respective sgRNAs, so as to reduce possible "off-target" effects.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Adam Moser, Kevin Range, and D. M. Y. (2008a). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.021>.Binding
- Adam Moser, Kevin Range, and D. M. Y. (2008b). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.014>.TALEN
- Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2013). Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>
- Allers, K., & Schneider, T. (2015). CCR5 $\Delta$ 32 mutation and HIV infection: Basis for curative HIV therapy. *Current Opinion in Virology*, 14, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.06.007>
- Antoniani, C., Meneghini, V., Lattanzi, A., Felix, T., Romano, O., Magrin, E., Weber, L., Pavani, G., Hoss, S. El, Kurita, R., Nakamura, Y., Cradick, T. J., Lundberg, A. S., Porteus, M., Amendola, M., Nemer, W. El, Cavazzana, M., Mavilio, F., & Miccio, A. (2018). Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human  $\beta$ -globin locus. *Blood*, 131(17), 1960–1973. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-811505>
- Asher, D. R., Thapa, K., Dharia, S. D., Khan, N., Potter, R. A., Rodino-Klapac, L. R., & Mendell, J. R. (2020). Clinical development on the frontier: gene therapy for duchenne muscular dystrophy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20(3), 263–274. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1725469>
- Barboric, M., Nissen, R. M., Kanazawa, S., Jabrane-ferrat, N., Peterlin, B. M., & Francisco, S. (2001). NF- $\kappa$  B Binds P-TEFb to Stimulate Transcriptional Elongation by RNA Polymerase II University of California at San Francisco Medical Faculty of the University of Ljubljana. *Molecular Cell*, 8, 327–337.
- Barman, A., Deb, B., & Chakraborty, S. (2020). A glance at genome editing with CRISPR–Cas9 technology. *Current Genetics*, 66(3), 447–462. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01040-3>
- Basha, G., Novobrantseva, T. I., Rosin, N., Tam, Y. Y. C., Hafez, I. M., Wong, M. K., Sugo, T., Ruda, V. M., Qin, J., Klebanov, B., Ciufolini, M., Akinc, A., Tam, Y. K., Hope, M. J., & Cullis, P. R. (2011). Influence of cationic lipid composition on gene silencing properties of lipid nanoparticle formulations of siRNA in antigen-presenting cells. *Molecular Therapy*, 19(12), 2186–2200. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.190>
- Bei, Y. (2017a). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1002/anie.201506030>.Efficient
- Bei, Y. (2017b). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.064>.CRISPR-mediated
- Bell, N. M., & Lever, A. M. L. (2013). HIV Gag polyprotein: Processing and early viral particle assembly. *Trends in Microbiology*, 21(3), 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.006>
- Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D. J., Trautman, J. K., Smith, J., Kim, Y.-G., & Chandrasegaran, S. (2001). Stimulation of Homologous Recombination through Targeted Cleavage by Chimeric Nucleases. *Molecular and Cellular Biology*, 21(1), 289–297. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.1.289-297.2001>
- Boon, C. J. F., & Wijnholds, J. (2017). Retinal Gene Therapy: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 380. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7522-8>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer

- statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.  
<https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Breiding, M. J. (2014). 肌肉作为内分泌和旁分泌器官 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 63(8), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001.Crystal>
- BrounsRutering, J., Ilmer, M., Recio, A., Coleman, M., Vykoukal, J., Alt, E., & Orleans, N. (2008). Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science*, 5(6), 1–8.  
<https://doi.org/10.1126/science.1159689.Small>
- Campbell, L. A., Coke, L. M., Richie, C. T., Fortuno, L. V., Park, A. Y., & Harvey, B. K. (2019). Gsicle-Mediated Delivery of CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complex for Inactivating the HIV Provirus. *Molecular Therapy*, 27(1), 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.10.002>
- Carroll, D. (2014). Genome engineering with targetable nucleases. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 83, pp. 409–439). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035418>
- Carter, B. J. (2004). Adeno-associated virus and the development of adeno-associated virus vectors: A historical perspective. *Molecular Therapy*, 10(6), 981–989.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.09.011>
- Charpentier, E., & Marraffini, L. A. (2014). Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. *Current Opinion in Microbiology*, 19(1), 114–119.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.07.001>
- Chavez, L., Calvanese, V., & Verdin, E. (2015). HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells. *PLoS Pathogens*, 11(6), 1–21.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004955>
- Check, E. (2005). Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature*, 433(7026), 561.  
<https://doi.org/10.1038/433561a>
- Check, E., Brumfiel, G., Baldwin, D., Reichhardt, T., & Powell, K. (2002). *Regulators split on gene therapy as patient shows signs of cancer China ponders joining fusion project gives Pluto a rocky outlook Call for clinical-trial reform leaves critics unmoved*. 419(October).
- Chemello, F., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2020). Correction of muscular dystrophies by CRISPR gene editing. *Journal of Clinical Investigation*, 130(6), 2766–2776.  
<https://doi.org/10.1172/JCI136873>
- Chen, F., Alphonse, M., & Liu, Q. (2020). Strategies for nonviral nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12(3), 1–14. <https://doi.org/10.1002/wnan.1609>
- Chen, H., Choi, J., & Bailey, S. (2014). Cut site selection by the two nuclease domains of the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 289(19), 13284–13294.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.539726>
- Chen, M., Mao, A., Xu, M., Weng, Q., Mao, J., & Ji, J. (2019). CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Cancer Letters*, 447(October 2018), 48–55.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.017>
- Chen, Shengmiao, Yao, Y., Zhang, Y., & Fan, G. (2020). CRISPR system: Discovery, development and off-target detection. *Cellular Signalling*, 70(December 2019), 109577.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109577>
- Chen, Shuliang, Yu, X., & Guo, D. (2018). CRISPR-Cas targeting of host genes as an antiviral

- strategy. *Viruses*, 10(1), 1–28. <https://doi.org/10.3390/v10010040>
- Cheng, X., Fan, S., Wen, C., & Du, X. (2020). CRISPR/Cas9 for cancer treatment: Technology, clinical applications and challenges. *Briefings in Functional Genomics*, 19(3), 209–214. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elaa001>
- Cho. (2016a). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 100–106. <https://doi.org/10.1038/nature16933>. Persistent
- Cho. (2016b). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.080>. A
- Choi, J. G., Dang, Y., Abraham, S., Ma, H., Zhang, J., Guo, H., Cai, Y., Mikkelsen, J. G., Wu, H., Shankar, P., & Manjunath, N. (2016). Lentivirus pre-packed with Cas9 protein for safer gene editing. *Gene Therapy*, 23(7), 627–633. <https://doi.org/10.1038/gt.2016.27>
- Chou, Y. Y., Krupp, A., Kaynor, C., Gaudin, R., Ma, M., Cahir-Mcfarland, E., & Kirchhausen, T. (2016). Inhibition of JCPyV infection mediated by targeted viral genome editing using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports*, 6(October), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep36921>
- Crane, A. M., Kramer, P., Bui, J. H., Chung, W. J., Li, X. S., Gonzalez-garay, M. L., Hawkins, F., Liao, W., Mora, D., Choi, S., Wang, J., Sun, H. C., Paschon, D. E., Guschin, D. Y., Gregory, P. D., Kotton, D. N., Holmes, M. C., Sorscher, E. J., & Davis, B. R. (2015). Stem Cell Reports. *Stem Cell Reports*, 4(4), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.02.005>
- Daniel J. Dickinson<sup>1, 3</sup>, Jordan D. Ward<sup>4</sup>, David J. Reiner<sup>2, 3, 5</sup>, and Bob Goldstein<sup>1, 3</sup>  
<sup>1</sup>Department of Biology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA  
<sup>2</sup>Department of Pharmacology, University of North Carolina at Chapel Hill, Cha, U. (2013). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1038/nm.4170>. A
- Das, A. T., Binda, C. S., & Berkhout, B. (2019). Elimination of infectious HIV DNA by CRISPR–Cas9. *Current Opinion in Virology*, 38, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.07.001>
- Daya, S., & Berns, K. I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 583–593. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-08>
- De La Fuente-Núñez, C., & Lu, T. K. (2017). CRISPR-Cas9 technology: applications in genome engineering, development of sequence-specific antimicrobials, and future prospects. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 9(2), 109–122. <https://doi.org/10.1039/c6ib00140h>
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- Dever, D. P., Bak, R. O., Reinisch, A., & Camarena, J. (2018). *Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts CRISPR / Cas9 Beta-globin Gene Targeting in Human Hematopoietic Stem Cells*. 539(7629), 384–389. <https://doi.org/10.1038/nature20134>. CRISPR/Cas9
- Deyle, D. R., & Russell, D. W. (2009). Adeno-associated virus vector integration. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 11(4), 442–447.
- Ding, Q., Lee, Y., Schaefer, E. a K., Peters, D. T., Veres, A., Kim, K., Kuperwasser, N., Motola, D. L., Torsten, B., Hendriks, W. T., Trevisan, M., Gupta, R. M., Moisan, A., Friesen, M., Schinzel, R. T., Xia, F., Tang, A., Xia, Y., Rubin, L., ... Chad, a. (2014). *Based Disease Models*. 12(2), 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.011>. A
- Doms. (n.d.). *Doms\_2001\_Chemokine Receptors and HIV entry.pdf*.

- Duan, D. (2018). Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy*, 26(10), 2337–2356. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.011>
- Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., & Koyanagi, Y. (2013). Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Scientific Reports*, 3, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep02510>
- Ebrahimi, V., & Hashemi, A. (2020). Challenges of in vitro genome editing with CRISPR/Cas9 and possible solutions: A review. *Gene*, 753(2660), 144813. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144813>
- Echigoya, Y., Lim, K. R. Q., Nakamura, A., & Yokota, T. (2018). Multiple exon skipping in the duchenne muscular dystrophy hot spots: Prospects and challenges. *Journal of Personalized Medicine*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/jpm8040041>
- Eiges, R., Schuldiner, M., Drukker, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., & Benvenisty, N. (2001). Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells. *Current Biology*, 11(7), 514–518. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00144-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00144-0)
- Faheem Ahmed, K., N.S., P., H., C.-J., Z., A., M., J., A., Z., F.A., K., M.R., H., & Z., S. (2016). CRISPR/Cas9 therapeutics: A cure for cancer and other genetic diseases. *Oncotarget*, 7(32), 52541–52552.
- Falzarano, M. S., Scotton, C., Passarelli, C., & Ferlini, A. (2015). Duchenne muscular dystrophy: From diagnosis to therapy. *Molecules*, 20(10), 18168–18184. <https://doi.org/10.3390/molecules201018168>
- Fan, Z., Perisse, I. V., Cotton, C. U., Regouski, M., Meng, Q., Domb, C., Wettere, A. J. Van, Wang, Z., Harris, A., White, K. L., & Polejaeva, I. A. (2018). RESEARCH ARTICLE A sheep model of cystic fibrosis generated by CRISPR / Cas9 disruption of the CFTR gene. 3(19), 1–12.
- Fätkenheuer, G., Nelson, M., Lazzarin, A., Konourina, I., Hoepelman, A. I. M., Lampiris, H., Hirschel, B., Tebas, P., Raffi, F., Trottier, B., Bellos, N., Saag, M., Cooper, D. A., Westby, M., Tawadrous, M., Sullivan, J. F., Ridgway, C., Dunne, M. W., Felstead, S., ... van der Ryst, E. (2008). Subgroup Analyses of Maraviroc in Previously Treated R5 HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine*, 359(14), 1442–1455. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0803154>
- Fernández, A., Josa, S., & Montoliu, L. (2017). A history of genome editing in mammals. *Mammalian Genome*, 28(7–8), 237–246. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9699-2>
- Finotti, A., Breda, L., Lederer, C. W., Bianchi, N., Zuccato, C., Kleanthous, M., Rivella, S., & Gambari, R. (2015). Recent trends in the gene therapy of  $\beta$ -thalassemia. *Journal of Blood Medicine*, 6, 69–85. <https://doi.org/10.2147/JBM.S46256>
- Fonslow, B. R., Stein, B. D., Webb, K. J., Xu, T., Choi, J., Kyu, S., & Iii, J. R. Y. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9- mediated gene inactivation. *Nature Biotechnology*, 32(12), 1262–1267. <https://doi.org/10.1038/nbt.3026>
- Fuenmayor, J., Gòdia, F., & Cervera, L. (2020). Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . January.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 31, Issue 7, pp. 397–405). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>
- Gallastegui, E., Millan-Zambrano, G., Terme, J.-M., Chavez, S., & Jordan, A. (2011). Chromatin

Reassembly Factors Are Involved in Transcriptional Interference Promoting HIV Latency. *Journal of Virology*, 85(7), 3187–3202. <https://doi.org/10.1128/jvi.01920-10>

Ganepola, S., Müßig, A., Allers, K., Ph, D., Schneider, T., Hofmann, J., Kücherer, C., Blau, O., Blau, I. W., Hofmann, W. K., Thiel, E., Ph, D., Hofmann, J., Ph, D., Kücherer, C., Blau, O., Blau, I. W., Hofmann, W. K., & Thiel, E. (2009). Long-Term Control of HIV by. *The New England Journal of Medicine*, 360(7), 692–697.

<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0802905>

Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H., & Moineau, S. (2010). The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67–71.

<https://doi.org/10.1038/nature09523>

Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39), 2579–2586.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>

Gee, P., Lung, M. S. Y., Okuzaki, Y., Sasakawa, N., Iguchi, T., Makita, Y., Hozumi, H., Miura, Y., Yang, L. F., Iwasaki, M., Wang, X. H., Waller, M. A., Shirai, N., Abe, Y. O., Fujita, Y., Watanabe, K., Kagita, A., Iwabuchi, K. A., Yasuda, M., ... Hotta, A. (2020). Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nature Communications*, 11(1), 4–20. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14957-y>

Geurts, A. M., Cost, G. J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Jeffrey, C., Choi, V. M., Jenkins, S. S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., Vincent, A., Lam, S., Michalkiewicz, M., Schilling, R., Kalloway, S., Weiler, H., Ménoret, S., Anegón, I., Davis, G. D., ... Buelow, R. (2010). *NIH Public Access*. 325(5939), 2009–2011. <https://doi.org/10.1126/science.1172447>. Knockout

Gilani, U., Shaikat, M., Rasheed, A., Shahid, M., Tasneem, F., Arshad, M., Rashid, N., & Shahzad, N. (2019). The implication of CRISPR/Cas9 genome editing technology in combating human oncoviruses. *Journal of Medical Virology*, 91(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/jmv.25292>

Gupta, D., Bhattacharjee, O., Mandal, D., Sen, M. K., Dey, D., Dasgupta, A., Kazi, T. A., Gupta, R., Sinharoy, S., Acharya, K., Chattopadhyay, D., Ravichandiran, V., Roy, S., & Ghosh, D. (2019). CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sciences*, 232(April), 116636. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116636>

Gutschner, T., Haemmerle, M., Genovese, G., Draetta, G. F., & Chin, L. (2016). Post-translational Regulation of Cas9 during G1 Enhances Homology-Directed Repair. *Cell Reports*, 14(6), 1555–1566. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.019>

Haeussler, M., & Concordet, J. P. (2016). Genome Editing with CRISPR-Cas9: Can It Get Any Better? *Journal of Genetics and Genomics*, 43(5), 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.04.008>

Haurwitz, R. E., Jinek, M., Wiedenheft, B., Zhou, K., & Doudna, J. A. (2010). Sequence- and Structure-Specific RNA Processing by a CRISPR Endonuclease Supporting Online Material for Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, 329(5997), 1355–1358.

Hauschild, J., Petersen, B., Santiago, Y., Queisser, A. L., Carnwath, J. W., Lucas-Hahn, A., Zhang, L., Meng, X., Gregory, P. D., Schwinzer, R., Cost, G. J., & Niemann, H. (2011). Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(29), 12013–12017.



<https://doi.org/10.1073/pnas.1106422108>

- Henriques, S. T., Costa, J., & Castanho, M. A. R. B. (2005). Translocation of  $\beta$ -galactosidase mediated by the cell-penetrating peptide pep-1 into lipid vesicles and human HeLa cells is driven by membrane electrostatic potential. *Biochemistry*, *44*(30), 10189–10198. <https://doi.org/10.1021/bi0502644>
- Hirsch, F., Iphofen, R., & Kaporc, Z. (2019). Ethics assessment in research proposals adopting CRISPR technology. *Biochemia Medica*, *29*(2), 206–213. <https://doi.org/10.11613/BM.2019.020202>
- Holkers, M., Maggio, I., Liu, J., Janssen, J. M., Miselli, F., Mussolino, C., Recchia, A., Cathomen, T., & Gonçalves, M. A. F. V. (2013). Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Research*, *41*(5). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1446>
- Horii, T., Arai, Y., Yamazaki, M., Morita, S., Kimura, M., Itoh, M., Abe, Y., & Hatada, I. (2014). Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Scientific Reports*, *4*(2), 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep04513>
- Horii, T., Tamura, D., Morita, S., Kimura, M., & Hatada, I. (2013). Generation of an ICF syndrome model by efficient genome editing of human induced pluripotent stem cells using the CRISPR system. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(10), 19774–19781. <https://doi.org/10.3390/ijms141019774>
- Hou, P., Chen, S., Wang, S., Yu, X., Chen, Y., Jiang, M., Zhuang, K., Ho, W., Hou, W., Huang, J., & Guo, D. (2015). Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Scientific Reports*, *5*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep15577>
- Hsu, P. D. (2014). Variations on the theme mental health in nursing. *Public Health Reports*, *71*(7), 700–704. <https://doi.org/10.2307/4589497>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, *157*(6), 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Hu, J. H., Maeder, M. L., & Joung, J. K. (2015). *Efficient delivery*. *33*(1), 73–80. <https://doi.org/10.1038/nbt.3081>. Efficient
- Hu, W., Kaminski, R., Yang, F., Zhang, Y., Cosentino, L., Li, F., Luo, B., Alvarez-Carbonell, D., Garcia-Mesa, Y., Karn, J., Mo, X., & Khalili, K. (2014). RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(31), 11461–11466. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405186111>
- Hütter, G., Bodor, J., Ledger, S., Boyd, M., Millington, M., Tsie, M., & Symonds, G. (2015). CCR5 targeted cell therapy for hiv and prevention of viral escape. *Viruses*, *7*(8), 4186–4203. <https://doi.org/10.3390/v7082816>
- Imperial, M. J., & Kochanek, S. (2004). Adenovirus vectors: Biology, design, and production. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *273*, 335–357. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-05599-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-662-05599-1_10)
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, *43*(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Javed, M. R., Sadaf, M., Ahmed, T., Jamil, A., Nawaz, M., Abbas, H., & Ijaz, A. (2018). CRISPR-Cas System: History and Prospects as a Genome Editing Tool in Microorganisms. *Current Microbiology*, *75*(12), 1675–1683. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1547-4>

- Jensen, T. I., Axelgaard, E., & Bak, R. O. (2019). Therapeutic gene editing in haematological disorders with CRISPR/Cas9. *British Journal of Haematology*, *185*(5), 821–835. <https://doi.org/10.1111/bjh.15851>
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). *CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms*. 505–531.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., Kaplan, M., Iavarone, A. T., Charpentier, E., Nogales, E., & Doudna, J. A. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, *343*(6176), 1–28. <https://doi.org/10.1126/science.1247997>
- Joung, J. K., & Yeh, J. J. (2012). *engineered TALENs*. *29*(8), 697–698. <https://doi.org/10.1038/nbt.1934>. Targeted
- Kaminski, R., Chen, Y., Salkind, J., Bella, R., Young, W. Bin, Ferrante, P., Karn, J., Malcolm, T., Hu, W., & Khalili, K. (2016). Negative Feedback Regulation of HIV-1 by Gene Editing Strategy. *Scientific Reports*, *6*(June), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep31527>
- Kanchiswamy, C. N., Maffei, M., Malnoy, M., Velasco, R., & Kim, J. S. (2016). Fine-Tuning Next-Generation Genome Editing Tools. *Trends in Biotechnology*, *34*(7), 562–574. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.03.007>
- Khalil, A. M. (2020). *The genome editing revolution : review*.
- Kim, J. H., Kwon, D. N., Lee, K., Kang, M. J., Choi, Y. J., Park, C., Whyte, J. J., Brown, A. N., Kim, J. H., Samuel, M., Mao, J., Park, K. W., Murphy, C. N., & Prather, R. S. (2013). Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs. *Scientific Reports*, *3*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep01981>
- Krishan, K. (2016). Human Genome Editing and Ethical Considerations. *Science and Engineering Ethics*, *22*(2), 597–599. <https://doi.org/10.1007/s11948-015-9675-8>
- Kunze, C., Börner, K., Kienle, E., Orschmann, T., Rusha, E., Schneider, M., Radivojkov-Blagojevic, M., Drukker, M., Desbordes, S., Grimm, D., & Brack-Werner, R. (2018). Synthetic AAV/CRISPR vectors for blocking HIV-1 expression in persistently infected astrocytes. *Glia*, *66*(2), 413–427. <https://doi.org/10.1002/glia.23254>
- LaFountaine, J. S., Fathe, K., & Smyth, H. D. C. (2015). Delivery and therapeutic applications of gene editing technologies ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9. *International Journal of Pharmaceutics*, *494*(1), 180–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.029>
- Lanigan, T. M., Kopera, H. C., & Saunders, T. L. (2020). Principles of genetic engineering. *Genes*, *11*(3), 1–21. <https://doi.org/10.3390/genes11030291>
- Lebbink, R. J., De Jong, D. C. M., Wolters, F., Kruse, E. M., Van Ham, P. M., Wiertz, E. J. H. J., & Nijhuis, M. (2017). A combinational CRISPR/Cas9 gene-editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape. *Scientific Reports*, *7*(September 2016), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep41968>
- Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zeng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., ... He, T. C. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes and Diseases*, *4*(2), 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>

- Lee, K., Conboy, M., Park, H. M., Jiang, F., Kim, H. J., Dewitt, A., Mackley, V. A., Chang, K., Rao, A., Skinner, C., Mehdipour, M., Liu, H., Huang, W., Lan, F., Bray, N. L., Li, S., Corn, J. E., Kataoka, K., & Doudna, J. A. (2018). *in vivo* induces homology-directed DNA repair. *Nat Biomed Eng.*, 889–901. <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0137-2>. Nanoparticle
- Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., Carte, J., Chen, W., Roark, N., Ranganathan, S., Ravinder, N., & Chesnut, J. D. (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *Journal of Biotechnology*, 208, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.024>
- Liao, H. K., Gu, Y., Diaz, A., Marlett, J., Takahashi, Y., Li, M., Suzuki, K., Xu, R., Hishida, T., Chang, C. J., Esteban, C. R., Young, J., & Belmonte, J. C. I. (2015). Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nature Communications*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms7413>
- Lim, S., Koo, J. H., & Choi, J. M. (2016). Use of cell-penetrating peptides in dendritic cell-based vaccination. *Immune Network*, 16(1), 33–43. <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.1.33>
- Lin, S., Staahl, B. T., Alla, R. K., & Doudna, J. A. (2014). Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *ELife*, 3, e04766. <https://doi.org/10.7554/eLife.04766>
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR : a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, 25(1), 1234–1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- Lisa Li, H., Nakano, T., & Hotta, A. (2014). Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications. In *Development Growth and Differentiation* (Vol. 56, Issue 1, pp. 63–77). <https://doi.org/10.1111/dgd.12107>
- Liu, J., Li, C., Yu, Z., Huang, P., Wu, H., Wei, C., Zhu, N., Shen, Y., Chen, Y., Zhang, B., Deng, W. M., & Jiao, R. (2012). Efficient and Specific Modifications of the Drosophila Genome by Means of an Easy TALEN Strategy. *Journal of Genetics and Genomics*, 39(5), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.04.003>
- Ma, D., Xu, Z., Zhang, Z., Chen, X., Zeng, X., Zhang, Y., Deng, T., Ren, M., Sun, Z., Jiang, R., & Xie, Z. (2019). Engineer chimeric Cas9 to expand PAM recognition based on evolutionary information. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08395-8>
- Ma, S., Zhang, S., Wang, F., Liu, Y., Liu, Y., Xu, H., Liu, C., Lin, Y., Zhao, P., & Xia, Q. (2012). Efficient and Specific Genome Editing in Silkworm Using Custom TALENs. *PLoS ONE*, 7(9), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045035>
- Ma, Y., Shen, B., Zhang, X., Lu, Y., Chen, W., Ma, J., Huang, X., & Zhang, L. (2014). Heritable multiplex genetic engineering in rats using CRISPR/Cas9. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089413>
- Ma, Y., Zhang, L., & Huang, X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS Journal*, 281(23), 5186–5193. <https://doi.org/10.1111/febs.13110>
- Maartens, G., Celum, C., & Lewin, S. R. (2014). HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, 384(9939), 258–271. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60164-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60164-1)
- Mahfouz, M. M., Li, L., Piatek, M., Fang, X., Mansour, H., Bangarusamy, D. K., & Zhu, J. K. (2012). Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein. *Plant Molecular Biology*, 78(3), 311–321. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9866-x>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M.

- (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Mangeot, Philippe E., Risson, V., Fusil, F., Marnef, A., Laurent, E., Blin, J., Mournetas, V., Massouridès, E., Sohier, T. J. M., Corbin, A., Aubé, F., Teixeira, M., Pinset, C., Schaeffer, L., Legube, G., Cosset, F. L., Verhoeyen, E., Ohlmann, T., & Ricci, E. P. (2019). Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Nature Communications*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07845-z>
- Mangeot, Philippe Emmanuel, Dollet, S., Girard, M., Ciancia, C., Joly, S., Peschanski, M., & Lotteau, V. (2011). Protein transfer into human cells by vsv-g-induced nanovesicles. *Molecular Therapy*, 19(9), 1656–1666. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.138>
- Manuscript, A. (2012). Transient mammalian cell transfection with PEI. *Changes*, 29(6), 997–1003. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5>.Transient
- Marraffini, L. A. (2015). CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*, 526(7571), 55–61. <https://doi.org/10.1038/nature15386>
- Metzger, M. J., McConnell-Smith, A., Stoddard, B. L., & Miller, A. D. (2011). Single-strand nicks induce homologous recombination with less toxicity than double-strand breaks using an AAV vector template. *Nucleic Acids Research*, 39(3), 926–935. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq826>
- Milone, M. C., & O’Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 32(7), 1529–1541. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0106-0>
- Mintz, R. L., Loike, J. D., & Fischbach, R. L. (2019). Will CRISPR Germline Engineering Close the Door to an Open Future? *Science and Engineering Ethics*, 25(5), 1409–1423. <https://doi.org/10.1007/s11948-018-0069-6>
- Mollanoori, H., & Teimourian, S. (2018). Therapeutic applications of CRISPR/Cas9 system in gene therapy. *Biotechnology Letters*, 40(6), 907–914. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2555-y>
- Montagna, C., Petris, G., Casini, A., Maule, G., Franceschini, G. M., Zanella, I., Conti, L., Arnoldi, F., Burrone, O. R., Zentilin, L., Zacchigna, S., Giacca, M., & Cereseto, A. (2018). VSV-G-Enveloped Vesicles for Traceless Delivery of CRISPR-Cas9. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 12(September), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.05.010>
- Moore, J. C., Van Laake, L. W., Braam, S. R., Xue, T., Tsang, S. Y., Ward, D., Passier, R., Tertoolen, L. L., Li, R. A., & Mummery, C. L. (2005). Human embryonic stem cells: Genetic manipulation on the way to cardiac cell therapies. *Reproductive Toxicology*, 20(3), 377–391. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.04.012>
- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lütge, F., Dannemann, N., Lahaye, T., & Cathomen, T. (2011). A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Research*, 39(21), 9283–9293. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr597>
- Ngwa, V. M., Axford, D. S., Healey, A. N., Nowak, S. J., Chrestensen, C. A., & McMurry, J. L. (2017). A versatile cell-penetrating peptide-adaptor system for efficient delivery of molecular cargos to subcellular destinations. *PLoS ONE*, 12(5), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178648>
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Nollette, L. R. (1985). Economics of Software Quality. *Northcon - Conference Record*, 28(4), 880–

884. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00057>.In
- Noy, A., & Gulick, R. M. (2018). Human immunodeficiency virus infection. *Wintrobe's Clinical Hematology: Fourteenth Edition*, 4188–4231.
- Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K. L., & Macallan, D. C. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Reviews in Medical Virology*, 23(4), 221–240. <https://doi.org/10.1002/rmv.1739>
- O'Brien, S. J., & Moore, J. P. (2000). The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunological Reviews*, 177(7), 99–111. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2000.17710.x>
- Olson, E. N. (2015). [Sarah Curtis] *HHS Public Access*. 345(6201), 1184–1188. <https://doi.org/10.1126/science.1254445>.Prevention
- Park, R. J., Wang, T., Koundakjian, D., Hultquist, J. F., Monel, B., Schumann, K., Yu, H., Kevin, M., Garcia-beltran, W., Piechocka-trocha, A., Krogan, N. J., Marson, A., Sabatini, D. M., Lander, E. S., Walker, B. D., Sciences, H., Francisco, S., Institutes, J. D. G., Francisco, S., ... Medical, H. (2017). *HHS Public Access*. 49(2), 193–203. <https://doi.org/10.1038/ng.3741.A>
- Patel, P., Ansari, M. Y., Bapat, S., Thakar, M., Gangakhedkar, R., & Jameel, S. (2014). The microRNA miR-29a is associated with human immunodeficiency virus latency. *Retrovirology*, 11(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0108-6>
- Pickar-oliver, A., Gersbach, C. A., & Biology, C. (2020). *applications*. 20(8), 490–507. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5>.The
- Pinder, J., Salsman, J., & Dellaire, G. (2015). Nuclear domain “knock-in” screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic Acids Research*, 43(19), 9379–9392. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv993>
- Pinto, D., Cohen-tannoudji, M., Robine, S., Marjou, F. E. L., Babinet, C., Louvard, D., Cnrs, U. M. R., & Morphogene, L. De. (1998). *I- Sce I-Induced Gene Replacement at a Natural Locus in Embryonic Stem Cells*. 18(3), 1444–1448.
- Portin, P. (n.d.). *The birth and development of the DNA theory of inheritance: sixty years since the discovery of the structure of DNA*.
- Pu, J., Frescas, D., Zhang, B., & Feng, J. (2015). Utilization of TALEN and CRISPR/Cas9 technologies for gene targeting and modification. *Experimental Biology and Medicine*, 240(8), 1065–1070. <https://doi.org/10.1177/1535370215584932>
- Qi, C., Li, D., Jiang, X., Jia, X., Lu, L., Wang, Y., Sun, J., Shao, Y., & Wei, M. (2018). Inducing CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 Homozygotes in the Human Jurkat CD4+ Cell Line and Primary CD4+ Cells by CRISPR-Cas9 Genome-Editing Technology. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 12(94), 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.05.012>
- Qian, L., Tang, M., Yang, J., Wang, Q., Cai, C., Jiang, S., Li, H., Jiang, K., Gao, P., Ma, D., Chen, Y., An, X., Li, K., & Cui, W. (2015). Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-musclcd phenotype in Meishan pigs. *Scientific Reports*, 5(June), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep14435>
- Radecke, S., Radecke, F., Cathomen, T., & Schwarz, K. (2010). Zinc-finger nuclease-induced gene repair with oligodeoxynucleotides: Wanted and unwanted target locus modifications. *Molecular Therapy*, 18(4), 743–753. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.304>
- Ramezankhani, R., Minaei, N., Haddadi, M., Torabi, S., Hesarak, M., Mirzaei, H., Vosough, M., & Verfaillie, C. M. (2021). Gene editing technology for improving life quality: A dream coming

- true? In *Clinical Genetics* (Vol. 99, Issue 1, pp. 67–83). Blackwell Publishing Ltd.  
<https://doi.org/10.1111/cge.13794>
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Sharp, P. A., & Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, *520*(7546), 186–191.  
<https://doi.org/10.1038/nature14299>
- Randhawa, S., & Sengar, S. (2021). *The evolution and history of gene editing technologies*.  
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.01.002>
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, *117*, 119–128.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>
- Ribeil, J., Arlet, J., Dussiot, M., Moura, I. C., Courtois, G., & Hermine, O. (2013). *Ineffective Erythropoiesis in  $\beta$ -Thalassemia, AHSP in erythropoiesis.pdf*. 2013.
- Richards et al. (2018). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *176*(5), 139–148.  
<https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1517746.Delivery>
- Robinson-Hamm, J. N., & Gersbach, C. A. (2016). Gene therapies that restore dystrophin expression for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Human Genetics*, *135*(9), 1029–1040. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1725-z>
- Rojo, F. P., Nyman, R. K. M., Johnson, A. A. T., Navarro, M. P., Ryan, M. H., Erskine, W., & Kaur, P. (2018). Crispr-cas systems: Ushering in the new genome editing era. *Bioengineered*, *9*(1), 214–221. <https://doi.org/10.1080/21655979.2018.1470720>
- Rose, J. D., Rhea, A. M., Weber, J., & Quiñones-Mateu, M. E. (2009). Current tests to evaluate HIV-1 coreceptor tropism. *Current Opinion in HIV and AIDS*, *4*(2), 136–142.  
<https://doi.org/10.1097/COH.0b013e328322f973>
- Rudin, N., Sugarman, E., & Haber, J. E. (1989). Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *122*(3), 519–534.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/122.3.519>
- Rumbwere Dube, B. N., Marshall, T. P., & Ryan, R. P. (2016). Predictors of human immunodeficiency virus (HIV) infection in primary care: A systematic review protocol. *Systematic Reviews*, *5*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0333-2>
- Saayman, S., Roberts, T. C., Morris, K. V., & Weinberg, M. S. (2015). HIV latency and the noncoding RNA therapeutic landscape. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 848).  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2432-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2432-5_9)
- Sahel, D. K., Mittal, A., & Chitkara, D. (2019). *Special Section on Drug Delivery Technologies — Minireview CRISPR / Cas System for Genome Editing : Progress and Prospects as a Therapeutic Tool*. September, 725–735. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.257287>
- Sakuma, T., Nishikawa, A., Kume, S., Chayama, K., & Yamamoto, T. (2014). Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Scientific Reports*, *4*, 4–9. <https://doi.org/10.1038/srep05400>
- Sanches-Da-Silva, G. D. N., Medeiros, L. F. S., & Lima, F. M. (2019). The Potential Use of the CRISPR-Cas System for HIV-1 Gene Therapy. *International Journal of Genomics*, 2019.  
<https://doi.org/10.1155/2019/8458263>
- Sathiyamoorthy, K., Jiang, J., Hu, Y. X., Rowe, C. L., Möhl, B. S., Chen, J., Jiang, W., Mellins, E. D., Longnecker, R., Zhou, Z. H., & Jardetzky, T. S. (2014). Assembly and Architecture of the EBV B

- Cell Entry Triggering Complex. *PLoS Pathogens*, 10(8).  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004309>
- Schwank, G., Koo, B. K., Sasselli, V., Dekkers, J. F., Heo, I., Demircan, T., Sasaki, N., Boymans, S., Cuppen, E., Van Der Ent, C. K., Nieuwenhuis, E. E. S., Beekman, J. M., & Clevers, H. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*, 13(6), 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.002>
- Sharma, G., Sharma, A. R., Bhattacharya, M., Lee, S., & Chakraborty, C. (2021). CRISPR-Cas9 : A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of Human Diseases. *Molecular Therapy*, 29(2), 571–586. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.028>
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
- Silva, G., Poirot, L., Galetto, R., Smith, J., Montoya, G., Duchateau, P., & Pâques, F. (2011). *Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering : Perspectives and Challenges for Gene Therapy*. 11–27.
- Smith, P. D., Meng, G., Salazar-Gonzalez, J. F., & Shaw, G. M. (2003). Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(5), 642–649. <https://doi.org/10.1189/jlb.0503219>
- Soiza, R. L., Donaldson, A. I. C., & Myint, P. K. (2018). Vaccine against arteriosclerosis: an update. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 9(6), 259–261. <https://doi.org/10.1177/https>
- Song, M., Kim, Y. H., Kim, J. S., & Kim, H. (2014). Genome engineering in human cells. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 546, Issue C). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00005-2>
- Song, X., Liu, C., Wang, N., Huang, H., He, S., Gong, C., & Wei, Y. (2021). Delivery of CRISPR/Cas systems for cancer gene therapy and immunotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 168, 158–180. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.04.010>
- Sternberg, S. H., LaFrance, B., Kaplan, M., & Doudna, J. A. (2015). Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9. *Nature*, 527(7576), 110–113. <https://doi.org/10.1038/nature15544>
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A. A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C. J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., ... Mirimanoff, R. O. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10(5), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)
- Sun, Y. (2017). 乳鼠心肌提取 {HHS} {Public} {Access}. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001079>.Functional
- Sunshine, S., Kirchner, R., Amr, S. S., Mansur, L., Shakhbatyan, R., Kim, M., Bosque, A., Siliciano, R. F., Planelles, V., Hofmann, O., Ho Sui, S., & Li, J. Z. (2016). HIV Integration Site Analysis of Cellular Models of HIV Latency with a Probe-Enriched Next-Generation Sequencing Assay. *Journal of Virology*, 90(9), 4511–4519. <https://doi.org/10.1128/jvi.01617-15>
- Swarthout, J. T., Raisinghani, M., & Cui, X. (2011). Zinc finger nucleases: A new era for transgenic animals. *Annals of Neurosciences*, 18(1), 25–28. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.1118109>
- Swarts, D. C., Mosterd, C., van Passel, M. W. J., & Brouns, S. J. J. (2012). CRISPR interference

- directs strand specific spacer acquisition. *PLoS ONE*, 7(4), 1–7.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035888>
- To, L., & Editor, T. H. E. (2017). A non-viral CRISPR / Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and pscsk9 in vivo. 5, 440–443. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.16>
- Torres-Ruiz, R., & Rodriguez-Perales, S. (2017). CRISPR-Cas9 technology: Applications and human disease modelling. *Briefings in Functional Genomics*, 16(1), 4–12.  
<https://doi.org/10.1093/bfgp/elw025>
- Tycko, J., Myer, V. E., & Hsu, P. D. (2016). Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Molecular Cell*, 63(3), 355–370. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.004>
- Uddin, F., Rudin, C. M., & Sen, T. (2020). CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Frontiers in Oncology*, 10(August).  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01387>
- Urnov, F. D., Miller, J. C., Lee, Y. L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., Jamieson, A. C., Porteus, M. H., Gregory, P. D., & Holmes, M. C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 435(7042), 646–651.  
<https://doi.org/10.1038/nature03556>
- Vannucci, L., Lai, M., Chiappesi, F., Ceccherini-Nelli, L., & Pistello, M. (2013). Viral vectors: A look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiologica*, 36(1), 1–22.
- Waddington, S. N., Privolizzi, R., Karda, R., & O’Neill, H. C. (2016). A Broad Overview and Review of CRISPR-Cas Technology and Stem Cells. *Current Stem Cell Reports*, 2(1), 9–20.  
<https://doi.org/10.1007/s40778-016-0037-5>
- Wager, M. G. T. and J. F. S. (2011). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
- Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., & Das, A. T. (2016). CRISPR-Cas9 can inhibit HIV-1 replication but NHEJ repair facilitates virus escape. *Molecular Therapy*, 24(3), 522–526.  
<https://doi.org/10.1038/mt.2016.24>
- Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., & Das, A. T. (2018a). CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Research*, 244(July 2017), 321–332.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.020>
- Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., & Das, A. T. (2018b). CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Research*, 244(May 2017), 321–332.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.020>
- Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., Das, A. T., Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., & Das, A. T. (2016). Report A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes All Infectious Provirus in Infected T Cell Report A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes All Infectious Provirus in Infected T Cell Cultures. *CellReports*, 17(11), 2819–2826. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.057>
- Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 227–264. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014607>
- Wang, H. X., Li, M., Lee, C. M., Chakraborty, S., Kim, H. W., Bao, G., & Leong, K. W. (2017). CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Disease Modeling and Therapy: Challenges and Opportunities for Nonviral Delivery. *Chemical Reviews*, 117(15), 9874–9906.  
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00799>



- Wang, J., Li, J., Zhao, H., Sheng, G., Wang, M., Yin, M., & Wang, Y. (2015). Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems. *Cell*, 163(4), 840–853. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.008>
- Wang, L., Li, F., Dang, L., Liang, C., Wang, C., He, B., Liu, J., Li, D., Wu, X., Xu, X., Lu, A., & Zhang, G. (2016). In Vivo delivery systems for therapeutic genome editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/ijms17050626>
- Wang, Q., Liu, S., Liu, Z., Ke, Z., Li, C., Yu, X., Chen, S., & Guo, D. (2018). Genome scale screening identification of SaCas9/gRNAs for targeting HIV-1 provirus and suppression of HIV-1 infection. *Virus Research*, 250(April), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.04.002>
- Wang, W., Ye, C., Liu, J., Zhang, D., Kimata, J. T., & Zhou, P. (2014). CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. *PLoS ONE*, 9(12), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115987>
- Wang, Z., Pan, Q., Gendron, P., Zhu, W., Guo, F., Cen, S., Wainberg, M. A., & Liang, C. (2016). CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Reports*, 15(3), 481–489. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.042>
- Wei, C., Liu, J., Yu, Z., Zhang, B., Gao, G., & Jiao, R. (2013). TALEN or Cas9 - Rapid, Efficient and Specific Choices for Genome Modifications. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(6), 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.03.013>
- Williamson, S. (2003). Adaptation in the env gene of HIV-1 and evolutionary theories of disease progression. *Molecular Biology and Evolution*, 20(8), 1318–1325. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg144>
- Wu, X., Kriz, A. J., & Sharp, P. A. (2014). Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quantitative Biology*, 2(2), 59–70. <https://doi.org/10.1007/s40484-014-0030-x>
- Xiao, Q., Guo, D., & Chen, S. (2019). Application of CRISPR/Cas9-based gene editing in HIV-1/AIDS therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(MAR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00069>
- Xiaolei Su<sup>1, 2,\*</sup>, Jonathon A. Ditlev<sup>1, 3,\*</sup>, Enfu Hui<sup>1, 2</sup>, Wenmin Xing<sup>1, 3</sup>, Sudeep Banjade<sup>1, 3</sup>, Julia Okrut<sup>1, 2</sup>, David S. King<sup>4</sup>, Jack Taunton<sup>1, 2</sup>, Michael K. Rosen<sup>1, 3</sup>, and Ronald D. Vale<sup>1, 2</sup>. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1038/nature21405>. Targeting
- Xu, L., Yang, H., Gao, Y., Chen, Z., Xie, L., Liu, Y., Liu, Y., Wang, X., Li, H., Lai, W., He, Y., Yao, A., Ma, L., Shao, Y., Zhang, B., Wang, C., Chen, H., & Deng, H. (2017). CRISPR/Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Molecular Therapy*, 25(8), 1782–1789. <https://doi.org/10.1016/j.jymthe.2017.04.027>
- Xu, X., Wan, T., Xin, H., Li, D., Pan, H., Wu, J., & Ping, Y. (2019). Delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic genome editing. *Journal of Gene Medicine*, 21(7), 1–18. <https://doi.org/10.1002/jgm.3107>
- Yang, Y., Wang, L., Bell, P., Mckenamin, D., He, Z., White, J., Yu, H., Xu, C., Morizono, H., Musunuru, K., Batshaw, M. L., & Wilson, J. M. (2016). Metabolic Liver Disease in Newborn Mice. *Nature Biotechnology*, 34(3), 334–338. <https://doi.org/10.1038/nbt.3469>
- Ye, L., Wang, J., Beyer, A. I., Teque, F., Cradick, T. J., Qi, Z., Chang, J. C., Bao, G., Muench, M. O., Yu, J., Levy, J. A., & Kan, Y. W. (2014). Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 $\Delta$ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(26), 9591–9596. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407473111>

- Ye, L., Wang, J., Tan, Y., Beyer, A. I., Xie, F., Muench, M. O., & Kan, Y. W. (2016). Genome editing using CRISPR-Cas9 to create the HPFH genotype in HSPCs: An approach for treating sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(38), 10661–10665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612075113>
- Yin, H., Song, C., Suresh, S., Wu, Q., Walsh, S., Rhym, L. H., Mintzer, E., Bolukbasi, M. F., Zhu, L. J., Kauffman, K., Mou, H., Oberholzer, A., Ding, J., Kwan, S., Bogorad, R. L., Zetsepın, T., Koteliansky, V., Wolfe, S. A., Xue, W., ... *Biology*, *1*. (2018). *HHS Public Access*. *35*(12), 1179–1187. <https://doi.org/10.1038/nbt.4005>. Structure-guided
- Yip, B. H. (2020). Recent advances in CRISPR/Cas9 delivery strategies. *Biomolecules*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/biom10060839>
- Yosef, I., Goren, M. G., & Qimron, U. (2012). Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, *40*(12), 5569–5576. <https://doi.org/10.1093/nar/gks216>
- You, L., Tong, R., Li, M., Liu, Y., Xue, J., & Lu, Y. (2019). Advancements and Obstacles of CRISPR-Cas9 Technology in Translational Research. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, *13*(June), 359–370. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.02.008>
- Youds, J. L., & Boulton, S. J. (2011). The choice in meiosis - Defining the factors that influence crossover or non-crossover formation. *Journal of Cell Science*, *124*(4), 501–513. <https://doi.org/10.1242/jcs.074427>
- Zhang, F., Cong, L., Lodato, S., Kosuri, S., Church, G., & Arlotta, P. (2011). Programmable Sequence-Specific Transcriptional Regulation of Mammalian Genome Using Designer TAL Effectors. *Nature Biotechnology*, *29*(2), 149–153. <https://doi.org/10.1038/nbt.1775>. Programmable
- Zhang, H., & McCarty, N. (2016). CRISPR-Cas9 technology and its application in haematological disorders. *British Journal of Haematology*, *175*(2), 208–225. <https://doi.org/10.1111/bjh.14297>
- Zhang, X. (2015). Gold Nanoparticles: Recent Advances in the Biomedical Applications. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *72*(3), 771–775. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0529-4>
- Zhao, B., Zou, J., Wang, H., Johannsen, E., Peng, C. W., Quackenbush, J., Mar, J. C., Morton, C. C., Freedman, M. L., Blacklow, S. C., Aster, J. C., Bernstein, B. E., & Kieff, E. (2011). Epstein-Barr virus exploits intrinsic B-lymphocyte transcription programs to achieve immortal cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(36), 14902–14907. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108892108>
- Zhen, S., Hua, L., Liu, Y. H., Gao, L. C., Fu, J., Wan, D. Y., Dong, L. H., Song, H. F., & Gao, X. (2015). Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus. *Gene Therapy*, *22*(5), 404–412. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.2>
- Zheng, N. (2020). *Molecular mechanisms , off-target activities , and clinical*. *May*, 412–426. <https://doi.org/10.1002/ctm2.34>
- Zhu, W., Lei, R., Le Duff, Y., Li, J., Guo, F., Wainberg, M. A., & Liang, C. (2015). The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology*, *12*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0150-z>
- Zuckermann, M., Hovestadt, V., Knobbe-Thomsen, C. B., Zapatka, M., Northcott, P. A., Schramm, K., Belic, J., Jones, D. T. W., Tschida, B., Moriarity, B., Largaespada, D., Roussel, M. F., Korshunov, A., Reifemberger, G., Pfister, S. M., Lichter, P., Kawachi, D., & Gronych, J. (2015).

Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. *Nature Communications*, 6(May), 1–9.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms8391>

Zych, A. O., Bajor, M., & Zagozdzon, R. (2018). Application of Genome Editing Techniques in Immunology. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 66(4), 289–298.  
<https://doi.org/10.1007/s00005-018-0504-z>