

SYSTÉM CRISPR-Cas9 A JEHO APLIKACE

EVA BENEŠOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Eva.Benesova@vscht.cz

Klíčová slova: CRISPR, systém CRISPR-Cas, editace genomu, genové terapie

Obsah

1. Úvod
2. Struktura systému CRISPR-Cas
3. Přirozené působení
4. Využití
 - 4.1. Nástroj pro editaci genomu
 - 4.2. Další možnosti využití systému CRISPR-Cas
5. Závěr

1. Úvod

Potenciál ukrytý v možnostech manipulace s DNA je znám již několik dekád. Stejně tak dlouho se vědecká komunita potýká s řadou komplikací, které jsou se snahou o specifický zásah do genetické informace člověka spojeny. Zdá se, že díky objevu systémů CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) ve spojení s nukleasami Cas (CRISPR-associated) se nyní otevírají zcela nové možnosti. Díky své jednoduchosti a přesnosti znamenala tato technologie zásadní přelom ve vývoji genového inženýrství a zatlačila do pozadí ostatní metody editace genomu, které byly do té doby dostupné, tedy nukleasy využívající DNA-vazebnou schopnost zinkových prstů či systém označovaný jako TALEN (transcription activator-like effector nuclease)^{1–3}.

První poznatky o sekvenci CRISPR se datují do druhé poloviny osmdesátých let a ve své době byly přijímány spíše jako zajímavá kuriozita než jako informace, které by mohly výrazně ovlivnit moderní vědu. Až s počátkem nového tisíciletí přichází pochopení skutečné funkce systému CRISPR-Cas a skutečný průlom v chápání potenciálu této technologie^{4,5}.

Jedná se o systém adaptivní imunity, který využívají některé bakterie (dostupná literatura hovoří cca o 45 % všech bakterií) a většina archeí (přibližně 85 %) jako obranu proti virové infekci, či případně proti dalším genetickým elementům, jako jsou například plasmidy či transpozony^{1,6,7}. Z toho plyne, že ačkoli je systém CRISPR-Cas obvykle zmiňován pouze jako protivirová obrana, může

hrát zásadní roli i v potlačení horizontálního přenosu genetické informace, což již bylo i několikrát experimentálně doloženo. Do budoucna lze určitě počítat s tím, že budou objeveny i další funkce tohoto zajímavého systému. Již dnes se mluví o vlivu na segregaci chromosomů, genovou expresi, evoluci genomu, opravu DNA či na vývoj patogenity. Přesný mechanismus těchto procesů však zůstává neznámý^{1,7}.

2. Struktura systému CRISPR-Cas

Systémy CRISPR-Cas jsou děleny na základě přítomných *cas* genů a vlastností vznikajícího efektorového komplexu. Základní klasifikace dělí tyto systémy do dvou tříd (I a 2), které jsou dále děleny do 6 typů a několika podtypů. Třída 1 obsahuje typy I, III a IV, zatímco do třídy 2 jsou řazeny typy II, V a VI (cit.^{7–9}). Hlavním rozpoznávacím znakem třídy 1 je využití proteinových komplexů obsahujících více proteinových podjednotek, zatímco třída 2 využívá efektorový komplex obsahující pouze jediný multidoménový protein^{8,10}. Do třídy 1 patří asi 90 % všech dosud identifikovaných CRISPR-Cas systémů¹⁰. Vůbec nejrozšířenějším typem je typ I, využívající nukleasu Cas3, který byl nalezen například u *E. coli*^{4,9}.

CRISPR-Cas systémy (nebo lépe řečeno jejich efektorový komplex) se od sebe liší i typem nukleové kyseliny, kterou rozpoznávají. Typy I, II, V a pravděpodobně IV jsou cíleny na DNA, zatímco typ VI na RNA. Systémy typu III jsou schopné štěpit jak DNA, tak RNA řetězce^{6,10}.

Z pohledu bakteriální buňky spočívá jedinečnost využívání systému CRISPR-Cas i ve skutečnosti, že imunitu k danému viru či jinému genetickému elementu nezískává pouze daná bakteriální buňka, ale i buňky dalších generací¹.

Pravděpodobně nejprostudovanější systém je v současné době systém z bakterie *Streptococcus pyogenes* obsahující Cas9 nukleasu, řazený do typu II. Oblíbenost jeho studia vyplývá mimo jiné i z jednoduchosti jeho efektorového komplexu tvořeného jediným proteinem. Z toho důvodu bude i tento článek věnován hlavně popisu mechanismu působení a využití právě tohoto systému. Intenzivní výzkum je však samozřejmě prováděn i s celou řadou dalších systémů CRISPR-Cas (cit.^{4,10}).

Zjednodušeně bychom si mohli sekvenci CRISPR představit jako archiv bakterie, ve kterém je možné dohledat informace o virech (či jiných genetických elementech), se kterými bakterie již v minulosti přišla do styku. Tato sekvence se skládá z identických repetitivních (obvykle připomínajících palindrom), které se střídají s tzv. spacers, neboli krátkými fragmenty DNA původem z cizorodého agens, tedy například viru. Tento archiv je doplňován vždy při setkání s novým typem viru (obr. 1). Délka repetitivních sekvencí a spacerů se v jednotlivých systémech může pod-

statně lišit. V případě repetitivních sekvencí se obvykle hovoří o hodnotách mezi 20 a 50 bp, v případě spacerů se délky fragmentů obvykle pohybují mezi 25 a 70 bp. Stejně tak se liší i počet spacerů inkorporovaných v různých systémech CRISPR-Cas, může se jednat o několik málo sekvencí, ale je možné se setkat i se systémy obsahujícími stovky různých spacerů. Zajímavá je i skutečnost, že v jednom genomu může být obsaženo i několik lokusů CRISPR (cit.¹).

Nezbytnou součástí celé mašinerie jsou i geny, kterými jsou kódovány nukleasy Cas. I tyto geny se nacházejí v lokusu CRISPR (obr. 1). Jejich hlavní funkce, ačkoli rozhodně ne jediná, je v cíleném štěpení cizorodé nukleové kyseliny (obvykle DNA), proti které je systém namířen^{7,8}. Některé z těchto nukleas můžeme nalézt ve většině CRISPR-Cas systémů (například nukleasy Cas1 a Cas2), jiné jsou typické pouze pro některé systémy¹. Mezi geny pro nukleasy Cas a sekvencí CRISPR se obvykle nachází sekvence nazývaná jako leader, která mimo jiné obsahuje promotor nezbytný pro transkripci sekvence CRISPR (cit.¹¹).

3. Přirozené působení

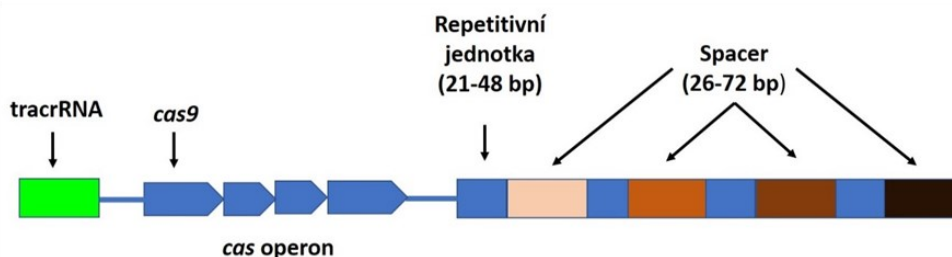
Proces přirozeného antivirového působení systémů CRISPR-Cas bude v následujících řádcích popsán na systému nejprostudovanějším, tedy CRISPR-Cas9 z bakterie *S. pyogenes*. Teoreticky je možné celý proces rozdělit do tří fází. V první, adaptační fázi dochází k již výše zmiňovanému zabudování části cizorodé DNA do DNA bakteriální buňky, konkrétně do sekvence CRISPR. V tomto procesu hrají důležitou roli nukleasy Cas1 a Cas2. Nezbytné jsou i další faktory, jako je například Cas9 či tracrRNA (trans-acting CRISPR RNA). Právě nutnost přítomnosti tracrRNA je pro systémy CRISPR-Cas typu II unikátní. Struktura tracrRNA je poměrně složitá, složená z části obsahující rozsáhlé sekundární struktury schopné vázat Cas9 a z části komplementární k repetitivním sekvencím crRNA, k jejíž syntéze dochází během druhé fáze procesu, jak bude popsáno o několik řádků dále. Nový spacer je u většiny systémů zabudován do sekvence CRISPR v blízkosti sekvence leader, z čehož plyne, že pořadí jednotlivých spacerů podává i informaci o chronologii viro-

vých infekcí dané bakterie^{1,2,6,8,10,11}.

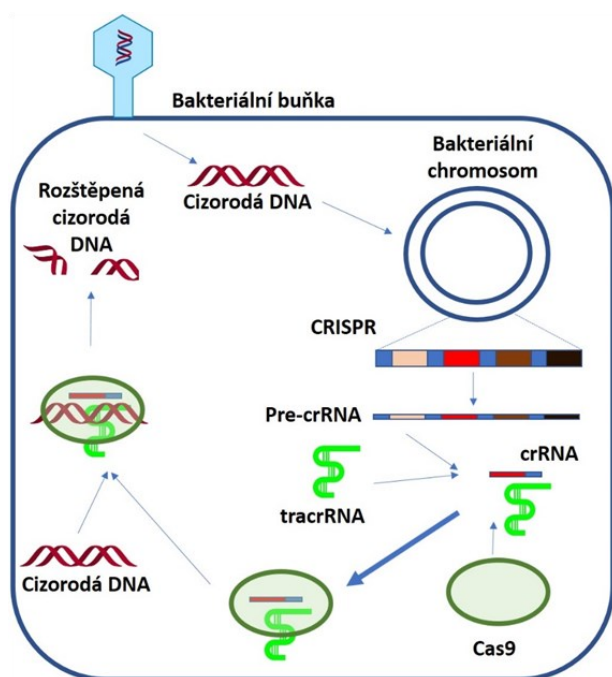
Během druhé fáze, tzv. exprese, je sekvence CRISPR přepisována do prekurzorové molekuly pre-crRNA. V podrobnostech průběhu tohoto kroku se jednotlivé typy systémů obvykle nejvíce liší. V případě CRISPR-Cas9 ze *S. pyogenes* interaguje molekula pre-crRNA s molekulou tracrRNA za vzniku duálního RNA hybridu, k jehož formaci a stabilizaci je nezbytná přítomnost Cas9. Další úpravy jsou katalyzovány RNasou III. Výsledkem těchto úprav je crRNA, která zůstává v komplexu s tracrRNA a nukleasou Cas9. Tento výsledný efektorový komplex je zodpovědný za štěpení cizorodé DNA. Pro úplnost ještě dodejme, že využití RNasy III je další z libůstek systémů typu II. U ostatních systémů je pre-crRNA štěpena nukleasami Cas (cit.^{1,2,6,8,10,12–15}).

Ve třetí fázi, která nastává například po opakované infekci bakterie stejným virem, je pomocí efektorového komplexu rozpoznána cizorodá DNA obsahující sekvenci odpovídající sekvenci již dříve zabudované do lokusu CRISPR (sekvence v cizorodé DNA se nazývá protospacer) a následně dochází k jejímu štěpení. Tato fáze bývá označována jako interference^{1,2,6,8}. Povšimněme si, že nukleasa Cas9 je u tohoto systému nezbytná k úspěšnému průběhu všech tří fází obranného procesu. Průběh celého procesu je schématicky naznačen na obr. 2.

Jak je však možné, že v průběhu závěrečného degračního procesu nedojde zároveň i k rozštěpení odpovídajících komplementárních míst v lokusu CRISPR samotné bakteriální buňky? Odpověď v sobě ukrývá sofistikovaný ochranný systém zprostředkovaný sekvencí PAM (protospacer adjacent motif), která se v případě cizorodé DNA nachází v bezprostřední blízkosti sekvence, která byla systémem zvolena jako vhodný spacer¹. Vzhledem k tomu, že sekvence PAM (2–5 bp) není přítomna v lokusu CRISPR hostitelské buňky, je efektorový komplex schopný rozlišit sekvence, které mají být štěpeny (cizorodé) a sekvence, které dotčeny být nemají (v lokusu CRISPR), ačkoli jsou identické. Sekvence PAM se u jednotlivých systémů liší a zároveň existují i systémy, které sekvence PAM využívat vůbec nemusí. Jedná se například o systémy cílené na RNA (například typy III a VI) (cit.⁶). Toto důmyslné opatření je však zároveň i zásadním omezením pro aplikaci systému CRISPR (cit.^{1,4,8}).



Obr. 1. Struktura systému CRISPR-Cas9 (typ II)



Obr. 2. Přírozený mechanismus působení systému CRISPR-Cas9. Přepřacováno podle³³. Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy.

Jako praktická modifikace přirozeného systému se ukázalo propojení crRNA a tracrRNA do jediné molekuly označované jako sgRNA (single guide RNA). Po interakci s Cas9 proteinem je tento komplex schopný výše popsaným způsobem katalyzovat vznik zlomů v přesně definovaném místě^{2,16,17}.

4. Využití

Technologie využívající systémy CRISPR-Cas9 je přínosem pro řadu různých oblastí, mezi něž patří například základní výzkum, léčba či diagnostika, profitovat z ní však mohou i nejrůznější oblasti biotechnologie a zemědělství. Stále nové systémy jsou objeveny a stávající jsou uměle modifikovány. Stejně tak přibývají nápady na možné využití těchto systémů, jak si ukážeme v následujících odstavcích^{1,3,4,6}. Z novinky se tak pomalu stává metoda rutinně používaná v mnoha laboratořích.

4.1. Nástroj pro editaci genomu

V první fázi cílené editace genomu je systém CRISPR-Cas pomocí vhodně navržené sgRNA naveden na konkrétní místo DNA, které má být modifikováno. Následně je využíváno skutečnosti, že eukaryotní buňka obsahuje aparát, díky kterému může docházet k opravě dvojitých zlomů na DNA. Přístupy, kterými k této opravě může dojít, jsou v zásadě dva. V prvním případě se jedná o homologní rekombinaci, ve druhém o nehomologní spojová-

ní volných konců. Homologní rekombinace vyžaduje ke svému průběhu přítomnost templátu. V případě, že jde o templát uměle připravený, obsahující sekvence homologní k sekvencím, které jsou přítomné po obou stranách vzniklého zlomu, může být využit k editaci na mnoha různých úrovních – inzerci, delecí či bodové mutaci apod. Nehomologní spojování volných konců probíhá bez přítomnosti templátové molekuly, z čehož plyne jeho značná chybovost. Tyto chyby (obvykle krátké inzerty nebo delecce, souhrnně označované pojmem indel) mohou vyústit v inaktivaci daného genu (například v důsledku posunu čtecího rámce apod.). Těto skutečnosti je možno využít v situacích, ve kterých je cílem editace potlačení činnosti daného genu^{1,2,16}.

Schopnost takto cíleného zásahu do genomu otevírá dosud nevídané možnosti nejen pro výzkum v oblasti molekulové genetiky, ale samozřejmě pro téměř všechna odvětví medicíny a zároveň i pro zemědělství. V současné době byly pokusy úspěšně provedeny jak v bakteriálních, tak například v rostlinných či savčích buňkách^{1,4}.

4.2. Další možnosti využití systému CRISPR-Cas

Ač to nemusí být na první pohled zřejmé, systém CRISPR-Cas9 je možné velice účinně využít i k regulaci genové exprese. Pomocí moderních technik je možné připravit tzv. „dead Cas9“ (v odborných publikacích bývá běžně označována jako dCas9), která má zachovanou schopnost vazby k DNA řetězci, ale potlačenou schopnost tuto DNA štěpit. Takto upravená Cas9 je obvykle pomocí sgRNA směřována do promotorové oblasti cílového genu. V této pozici buď pouze svou vazbou nebo v důsledku přítomnosti represoru, který na ni může být uměle připojen (například KRAB (Kruppel-associated box) doména v případě savčích buněk), inhibuje expresi daného genu. Důvody inhibice mohou být různé, mimo jiné například blokáda vazby RNA-polymerasy, vazba transkripčních faktorů apod. Obdobně, je-li vhodně připravena chimérická molekula Cas9 ve fúzi s aktivátorem transkripce (například VP16 (Virus Protein 16)), dochází k aktivaci genové exprese v důsledku podpoření vazby RNA-polymerasy. V souvislosti s inhibicí genové exprese pak hovoříme o technologii CRISPRi, v případě aktivace o technologii CRISPRa (cit. ^{1,2,4,16,18–20}). Modelů, které umožňují aktivaci či inhibici genové exprese bylo vytvořeno mnoho, jejich podrobný přehled je možné najít v následujících publikacích^{20–22}.

Velice často je nyní diskutována otázka, zda by systém CRISPR-Cas mohl vyřešit dnes velmi palčivou problematiku mikrobiální rezistence k antibiotikům. Některé zatím úspěšně provedené pokusy naznačují, že určitá naděje by tu být mohla⁴.

Základní myšlenkou je příprava antibiotik navržených dle aktuální potřeby. Vnesení nukleas, schopných štěpit DNA v místě, kam je navede vhodná molekula nukleové kyseliny, do cílového organismu je provedeno pomocí bakteriofágů nebo bakterií nesoucích plasmid vhodný pro konjugaci. Díky přesnému cílení antibiotik založených na technologii CRISPR-Cas je možné zajistit účinek pouze na

patogenní bakterie, zatímco například přirozená střevní mikroflóra zůstane nedotčena. Cílem může být jak gen zodpovědný za vznik patogenního produktu, tak například gen kódující protein zodpovídající za rezistenci ke klasickému antibiotiku. Stejně tak by se tento přístup dal využít během terapií onemocnění souvisejících se střevním mikrobiomem^{1,23}. Intenzivně se této oblasti výzkumu věnuje například společnost Eligo Bioscience²⁴.

V nedávné době byly publikovány i práce, ve kterých autoři sestrojili čipy využívající systém CRISPR-Cas. V těchto čípech byla nukleasa dCas9 v komplexu s příslušnou sgRNA imobilizovaná na grafenovém tranzistoru. Interakce komplementární (tedy zjišťované) DNA ze vzorku s tímto komplexem vyvolala výraznou změnu výstupního signálu, a to i bez nutnosti amplifikace DNA ve vzorku. Funkčnost těchto čipů byla prokázána i na vzorcích získaných od pacientů trpících Duchennovou svalovou dystrofií. Kromě testování genetických mutací by však podobné čipy jistě našly uplatnění i v základním výzkumu či při kontrole editované DNA například v potravinách^{25,26}.

Jako poslední příklad méně obvyklého uplatnění systému CRISPR-Cas může posloužit jeho využití v poměrně komplikovaném procesu vizualizace nukleových kyselin v živých buňkách. V tomto případě je dCas9 fluorescenčně značená (například ve fúzi s fluorescenčními proteiny). Na cílové místo je opět naváděna pomocí příslušné sgRNA. CRISPR-Cas v tomto případě poskytuje nástroj pro lepší pochopení buněčných procesů a jejich dynamiky^{4,27}.

Zde uvedený výčet možných aplikací systému CRISPR-Cas zdaleka není vyčerpávající. Řada prací se zabývá možnostmi modifikace epigenetických vzorů pomocí CRISPR-Cas technologie, jsou vyvíjeny systémy umožňující přerušení pouze jednoho z řetězců DNA a v dohledné době se nepochybně objeví i další zajímavé možnosti aplikace tohoto systému^{12,28–30}.

5. Závěr

Některé praktické aplikace systému CRISPR-Cas jsou již poměrně dostupné (například v základním výzkumu), na některé si budeme muset ještě nějaký čas počkat. Zájem široké veřejnosti je samozřejmě nejvíce upřen směrem k možným genovým terapiím. Zahájeny byly mimo jiné testy týkající se léčby nádorových onemocnění či onemocnění krve (například β -talasémie)³¹. Nicméně, veškeré klinické studie, které v současné době probíhají, jsou zatím v prvotních fázích. Pro zájemce o detailnější informace o klinických studiích zahrnujících technologie CRISPR-Cas doporučuji nahlédnout do databáze National Institutes of Health³².

S přibývajícím informacemi o systémech CRISPR-Cas zákonitě roste i množství otázek, na které je nutné hledat odpovědi. V současné době například ještě chybí řada informací týkajících se detailního mechanismu účinku jednotlivých typů CRISPR-Cas systémů, průběhu integrace spacerů do sekvence CRISPR, málo toho víme o možnostech horizontálního transferu a o regulaci těchto systémů. Zajímat bychom se měli i o jejich vliv na ekolo-

gii, ať již přirozeně nebo v případě jejich umělého použití v praxi^{1,4,10}. Prostor pro usilovnou práci výzkumných týmů dávají i některá omezení, které zatím aplikaci CRISPR-Cas systémů provázejí. Jedním z největších problémů je v současné době nebezpečí účinku systému CRISPR-Cas mimo místo, ve kterém byl zásah zamýšlen^{1,2,16}. Z toho důvodu jsou vyvíjeny indukovatelné systémy CRISPR-Cas, jejichž působení v organismu je možné cíleně ovlivnit a regulovat¹⁶. Modifikovány jsou i vlastnosti samotného Cas9 proteinu (velikost, specifita apod.). Neméně důležitá je i otázka, jak tento editační aparát účinně vnášet do cílových buněk. V současné době se obvykle využívají virové vektory, nicméně i jejich využití je provázeno nejruznějšími komplikacemi, včetně omezené velikosti možného inzertu^{4,10}. Vyřešena bude muset být však i řada otázek etického a legislativního charakteru. Jen tak bude možné zajistit, že se systém CRISPR-Cas plně začlení do běžné praxe.

Seznam zkratk

Cas	CRISPR-associated (nukleasa asociovaná s CRISPR)
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice)
KRAB	Kruppel-associated box
PAM	protospacer adjacent motif (motiv přiléhající k protospaceru)
sgRNA	single guide RNA (navádějící RNA)
TALEN	transcription activator-like effector nuclease (nukleasa s motivem podobným transkripčnímu aktivátoru)
VP16	Virus Protein 16 (virový protein 16)

LITERATURA

- Rath D., Amlinger L., Rath A., Lundgren M.: *Biochimie* 117, 119 (2015).
- Zhang S., Guo F., Yan W., Dai Z., Dong W., Zhou J., Zhang W., Xin F., Jiang M.: *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 459 (2020).
- Zatloukalová P., Krejčíř R., Valík D., Vojtěšek B.: *Klin. Onkol. MEDLINE* 32, 3S13 (2019).
- Liu H., Wang L., Luo Y.: *Synth. Syst. Biotechnol.* 3, 217 (2018).
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A.: *J. Bacteriol.* 169, 5429 (1987).
- Terns M. P.: *Mol. Cell* 72, 404 (2018).
- Zheng Z., Zhang Y., Liu Z., Dong Z., Xie C., Bravo A., Soberón M., Mahillon J., Sun M., Peng D.: *ISME J.* (2020). doi 10.1038/s41396-020-0623-5.
- Hille F., Richter H., Wong S. P., Bratovič M., Ressel S., Charpentier E.: *Cell* 172, 1239 (2018).
- Makarova K. S., Wolf Y. I., Koonin E. V.: *CRISPR J.* 1, 325 (2018).
- Shmakov S. a 12 spoluautorů: *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 169 (2017).

11. Alkhnbashi O. S., Shah S. A., Garrett R. A., Saunders S. J., Costa F., Backofen R.: *Bioinformatics* 32, i576 (2016).
12. Doudna J. A., Charpentier E.: *Science* 346, 1258096 (2014).
13. <https://international.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>, staženo 12. 4. 2020.
14. Bonomo M. E., Deem M. W.: *Phys. Biol.* 15, 041002 (2018).
15. Marraffini L. A., v knize: *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* (Ferretti J. J., Stevens D. L., Fischetti V. A., ed.), kap. The CRISPR-Cas system of *Streptococcus pyogenes*: function and applications. University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City 2016.
16. Zhang J., Chen L., Zhang J., Wang Y.: *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17, 1171 (2019).
17. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E.: *Science* 337, 816 (2012).
18. <https://www.cambioscience.com/2017/12/21/crispr-background-basics-part-2/>, staženo 21. 3. 2020.
19. Bikard D., Jiang W., Samai P., Hochschild A., Zhang F., Marraffini L. A.: *Nucleic Acids Res.* 41, 7429 (2013).
20. Qi L. S., Larson M. H., Gilbert L. A., Doudna J. A., Weissman J. S., Arkin A. P., Lim W. A.: *Cell* 152, 1173 (2013).
21. Gilbert L. A. a 12 spoluautorů: *Cell* 159, 647 (2014).
22. Konermann S. a 11 spoluautorů: *Nature* 517, 583 (2015).
23. Citorik R. J., Mimee M., Lu T. K.: *Nat. Biotechnol.* 32, 1141 (2014).
24. <https://eligo.bio/technology/>, staženo 27. 3. 2020.
25. Hajian R. a 15 spoluautorů: *Nat. Biomed. Eng.* 3, 427 (2019).
26. <https://www.bezpecnostpotravin.cz/detekce-zmen-dna-pomoci-crispr-cipu.aspx>, staženo 10. 4. 2020.
27. <https://www.synthego.com/guide/crispr-methods/crispr-imaging>, staženo 2. 4. 2020.
28. <https://www.genscript.com/epigenetic-editing-with-crispr-cas9.html>, staženo 2. 4. 2020.
29. Adli M.: *Nat. Commun.* 9, 1911 (2018).
30. Satomura A., Nishioka R., Mori H., Sato K., Kuroda K., Ueda M.: *Sci. Rep.* 7, 2095 (2017).
31. <https://synbiobeta.com/crispr-clinical-trials-a-2019-update/>, staženo 21. 3. 2020.
32. <https://clinicaltrials.gov/>, staženo 25. 3. 2020.
33. <http://sites.tufts.edu/crispr/crispr-background/adaptive-immune-system/>, staženo 21. 3. 2020.

E. Benešová (*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **CRISPR-Cas9 System and Its Application**

CRISPR-Cas systems, which were originally developed by bacteria as a defence against viral infection, have recently significantly expanded the possibility of targeted interventions in the genome of many different organisms, including humans. The main fields, in which CRISPR-Cas systems are applied, are medicine, diagnostics, basic research, biotechnology and agriculture. However, their research is still in its infancy, as new systems are being discovered, known systems modified and the possibilities of their application expanding at unprecedented speed.

Keywords: CRISPR, CRISPR-Cas system, genome editing, gene therapy