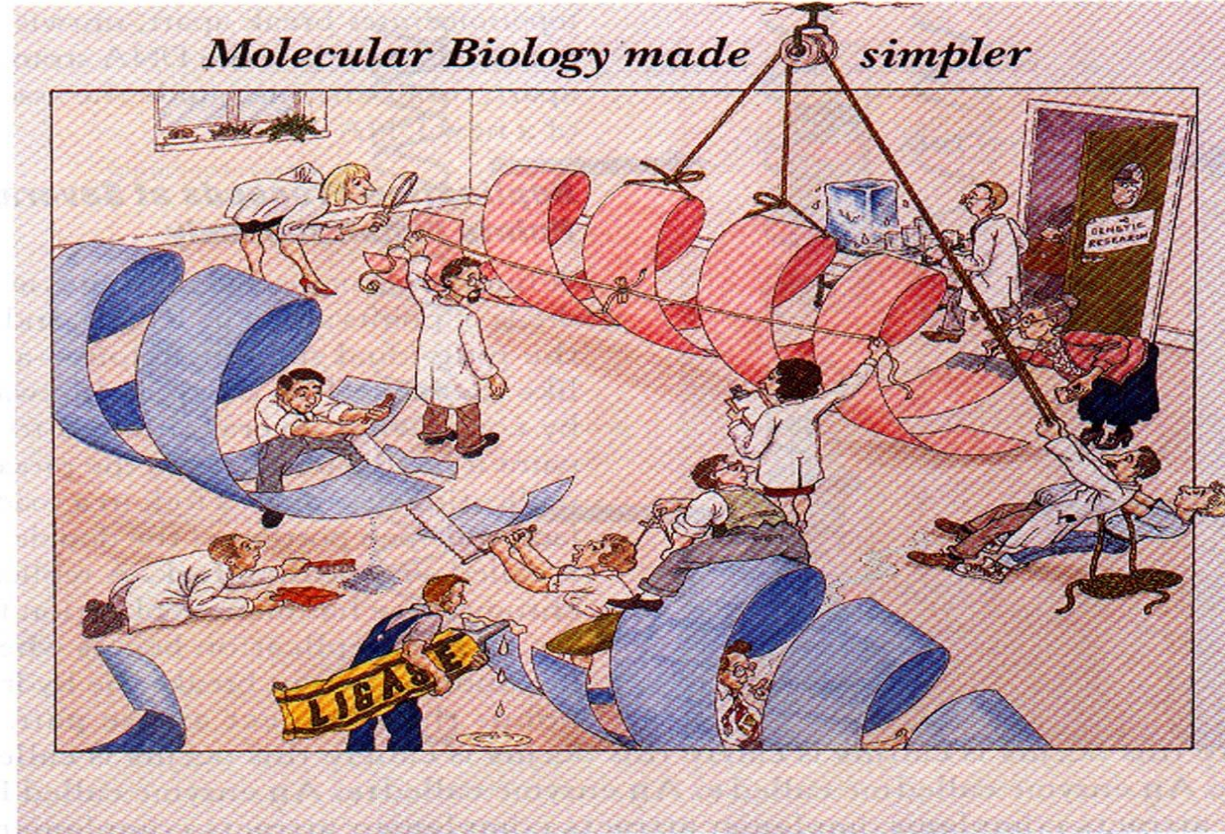
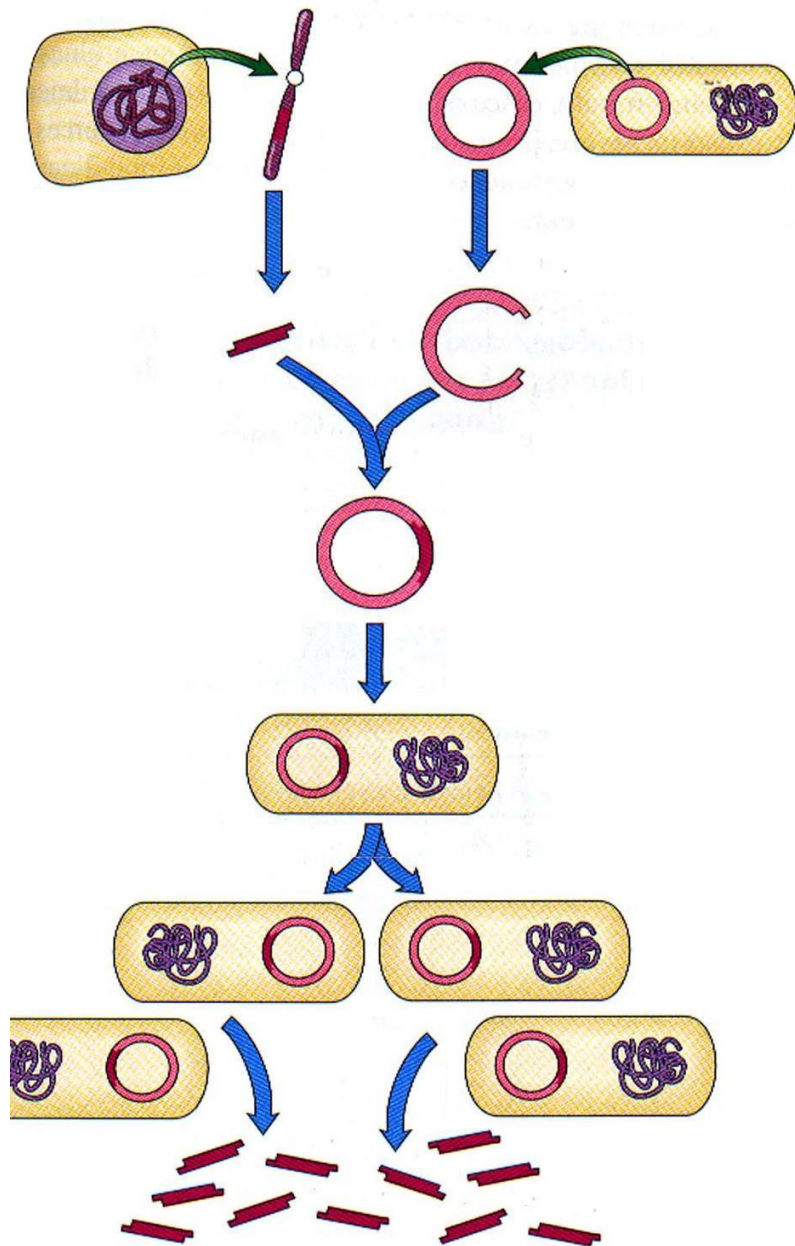


# Genetičko inženjerstvo ili tehnologija rekombinantne DNA



... niz metoda i tehnika kojima je moguće izolirati točno određeni gen iz genoma, umnožiti ga, promijeniti i vratiti u genom iste ili bilo koje druge vrste...



Temeljna tehnika  
genetičkog  
inženjerstva

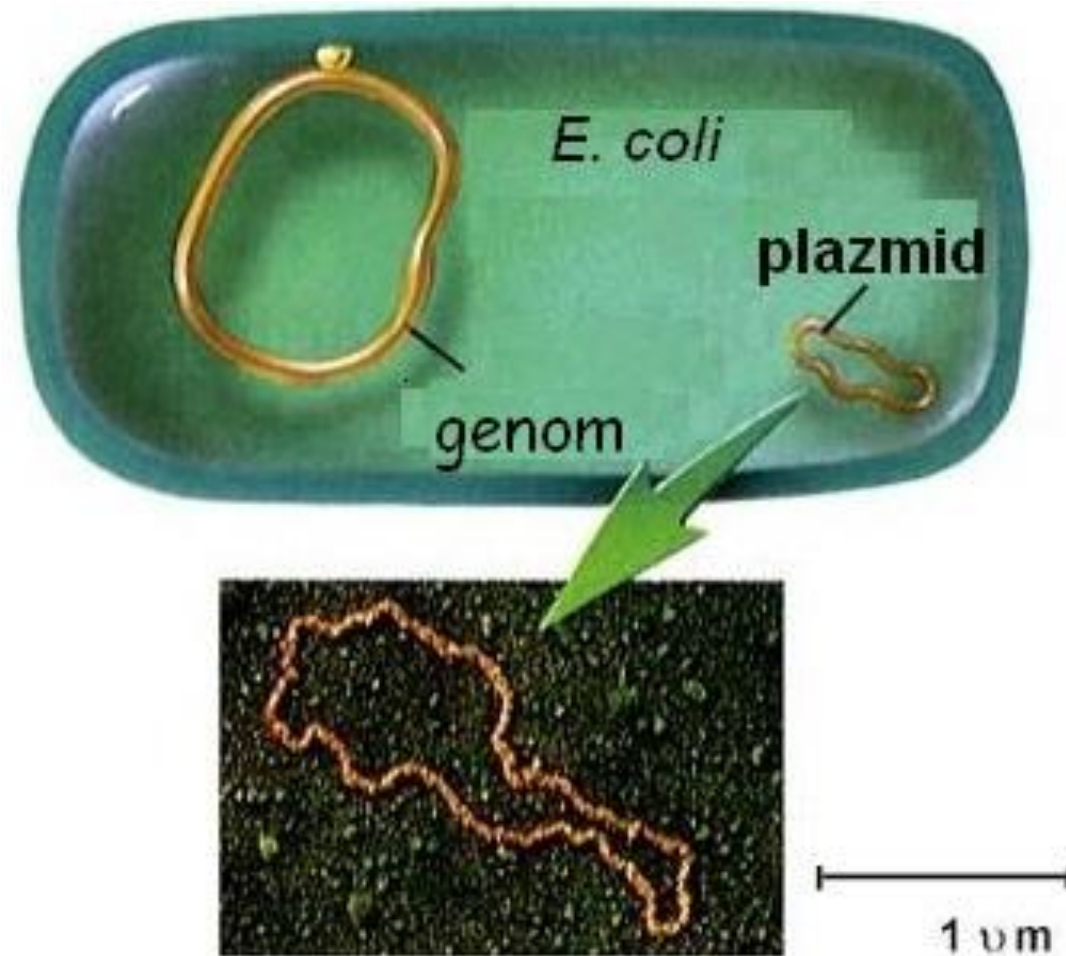
- kloniranje gena

# Temeljna oruđa

- Restriksijske endonukleaze*
- Plazmidi*
- DNA-ligaza*
- *bakterija E. coli*



# Plazmidi - male kružne dvolančane molekule DNA



circular,  
double-stranded  
plasmid DNA  
(cloning vector)



CLEAVAGE WITH  
RESTRICTION  
NUCLEASE

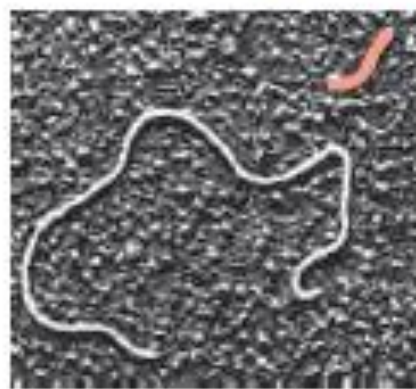


DNA fragment  
to be cloned

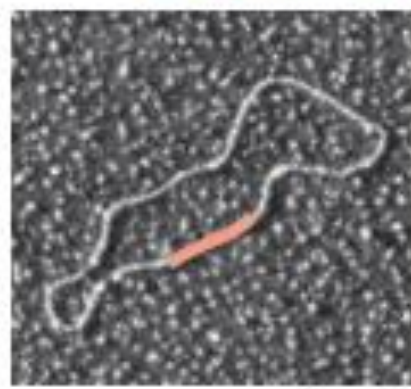


COVALENT  
LINKAGE  
BY DNA LIGASE

recombinant DNA



200 nm



200 nm

# Restriksijske endonukleaze

- enzimi iz bakterija koji prepoznaju točno određeni redoslijed nukleotida u molekuli DNA i precizno režu oba lanca
- osnovno oruđe u kloniranju gena
- restriksijski enzimi ne razlikuju DNA iz različitih organizama
- prepoznaju svoje specifično mjesto cijepanja u DNA
- sekvenca koju prepoznaju je **PALINDROM** (ima os simetrije, isto glasi kad se čita s oba lanca )



## The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978

"for the discovery of restriction enzymes and their application to problems of molecular genetics"



**Werner Arber**

🕒 1/3 of the prize

Switzerland

Biozentrum der  
Universität  
Basel, Switzerland

b. 1929



**Daniel Nathans**

🕒 1/3 of the prize

USA

Johns Hopkins University  
School of Medicine  
Baltimore, MD, USA

b. 1928  
d. 1999



**Hamilton O. Smith**

🕒 1/3 of the prize

USA

Johns Hopkins University  
School of Medicine  
Baltimore, MD, USA

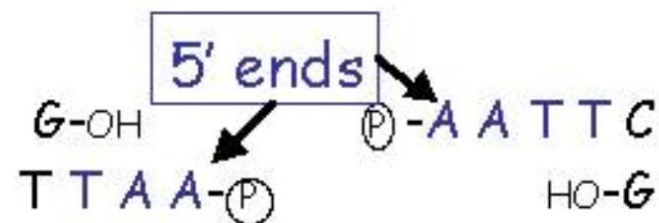
b. 1931



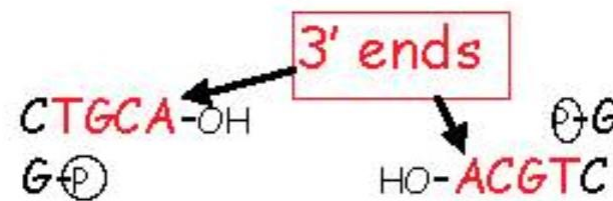
# Restriksijske endonukleaze

Enzyme	Restriction Site
<i>Bam</i> HI	
<i>Eco</i> RI	
<i>Hind</i> III	
<i>Hpa</i> II	
<i>Mbo</i> I	
<i>Hae</i> III	
<i>Eco</i> RV	

- Neki enzimi režući ostavljaju 5' stršeće ili ljepljive krajeve (npr. *Eco*RI)



- Neki enzimi ostavljaju 3' stršeće krajeve (npr. *Pst*I)



tupi krajevi



About 1000 restriction enzymes have been characterized. They are named by italicized three-letter codes, the first a capital letter denoting the genus of the organism of origin, while the next two letters are an abbreviation of the particular species. Because prokaryotes often contain more than one restriction enzyme, the various representatives are assigned letter and number codes as they are identified. Thus, *EcoRI* is the initial restriction endonuclease isolated from *Escherichia coli*, strain R.

Enzimi <sup>a</sup>	Izvor	Mjesto prepoznavanja <sup>b</sup>
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	GGATCC
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY13	GAATTC
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	AAGCTT
<i>Hpa</i> I	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	GTTAAC
<i>Hpa</i> II	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	CCGG
<i>Mbo</i> I	<i>Moraxella bovis</i>	GATC
<i>Not</i> I	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GCGGCCGC
<i>Sfi</i> I	<i>Streptomyces fimbriatus</i>	GGCCNNNNNGGCC
<i>Taq</i> I	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA

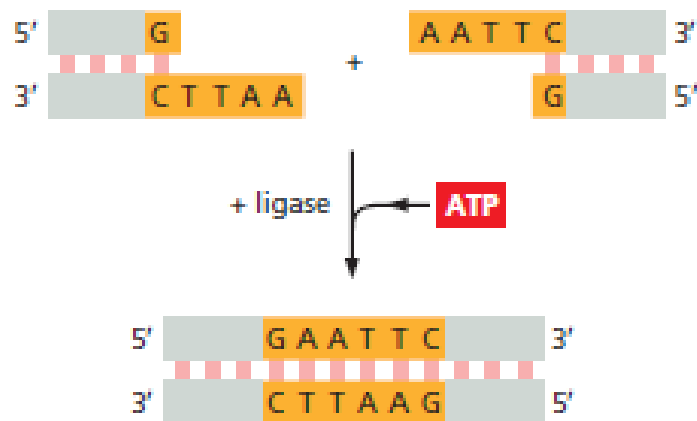
<sup>a</sup> Imena restriksijskih enzima izvode se iz imena organizma iz kojih su izolirani i rednoga broja koji omogućuje razlikovanje različitih enzima izoliranih iz istog organizma (primjerice *Hpa*I i *Hpa*II – dvaju različitih enzima izoliranih iz bakterije *Haemophilus parainfluenzae*).

<sup>b</sup> Mjesta prepoznavanja prikazana su samo kao slijed nukleotida jednoga lanca dvolančane DNA. »N« predstavlja bilo koju bazu.

Enzyme	Common Isoschizomers	Recognition Sequence	Compatible Cohesive Ends
<i>AluI</i>	<i>AtuI</i> , <i>EcoRII</i>	AG↓CT	Blunt
<i>ApyI</i>		CC↓( <sup>A</sup> <sub>T</sub> )GG	
<i>AsuII</i>		TT↓CGAA	<i>ClaI</i> , <i>HpaII</i> , <i>TaqI</i>
<i>AvaI</i>		G↓PyCGPuG	<i>SalI</i> , <i>XhoI</i> , <i>XmaI</i>
<i>AvrII</i>		C↓CTAGG	
<i>BalI</i>		TGG↓CCA	Blunt
<i>BamHI</i>		G↓GATCC	<i>BclI</i> , <i>BglII</i> , <i>MboI</i> , <i>Sau3A</i> , <i>XhoII</i>
<i>BclI</i>		T↓GATCA	<i>BamHI</i> , <i>BglII</i> , <i>MboI</i> , <i>Sau3A</i> , <i>XhoII</i>
<i>BglII</i>		A↓GATCT	<i>BamHI</i> , <i>BclI</i> , <i>MboI</i> , <i>Sau3A</i> , <i>XhoII</i>
<i>BstEII</i>		G↓GTNACC	
<i>BstXI</i>	<i>AtuI</i> , <i>ApyI</i>	CCANNNNN↓NTGG	
<i>ClaI</i>		AT↓CGAT	<i>AccI</i> , <i>AcyI</i> , <i>AsyII</i> , <i>HpaII</i> , <i>TaqI</i>
<i>DdeI</i>		C↓TNAG	
<i>EcoRI</i>		G↓AATTC	
<i>EcoRII</i>		↓CC ( <sup>A</sup> <sub>T</sub> )GG	
<i>FnuDII</i>		CG↓CG	Blunt
<i>HaeI</i>		( <sup>A</sup> <sub>T</sub> )GG↓CC( <sup>T</sup> <sub>A</sub> )	Blunt
<i>HaeII</i>		PuGCGC↓Py	
<i>HaeIII</i>		GG↓CC	Blunt
<i>HincII</i>		GTPy↓PuAC	Blunt
<i>HindIII</i>	<i>ThaI</i>	A↓AGCTT	

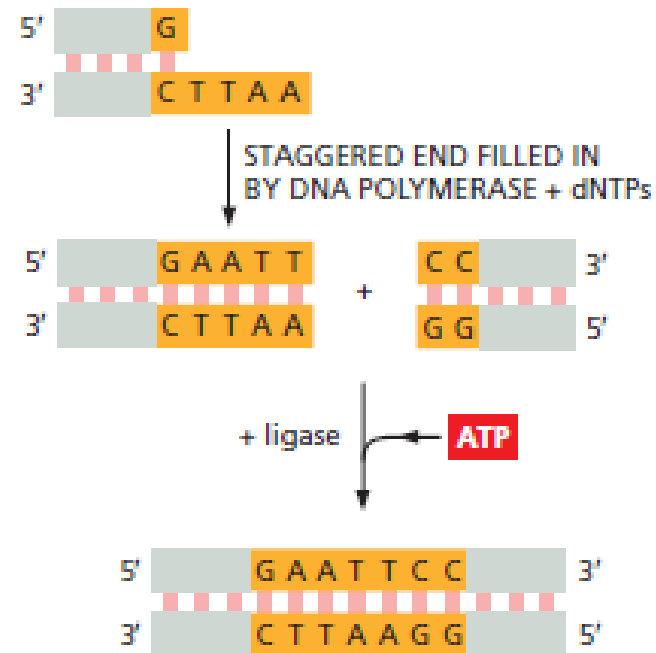
# U kloniranju je važno imati komplementarne krajeve DNA

Insert i vektor porezani s **ISTIM** enzimom!



(A) JOINING TWO FRAGMENTS CUT BY THE SAME RESTRICTION NUCLEASE

Ljepljivi krajevi „popunjeni“ DNA polimerazom u tupe

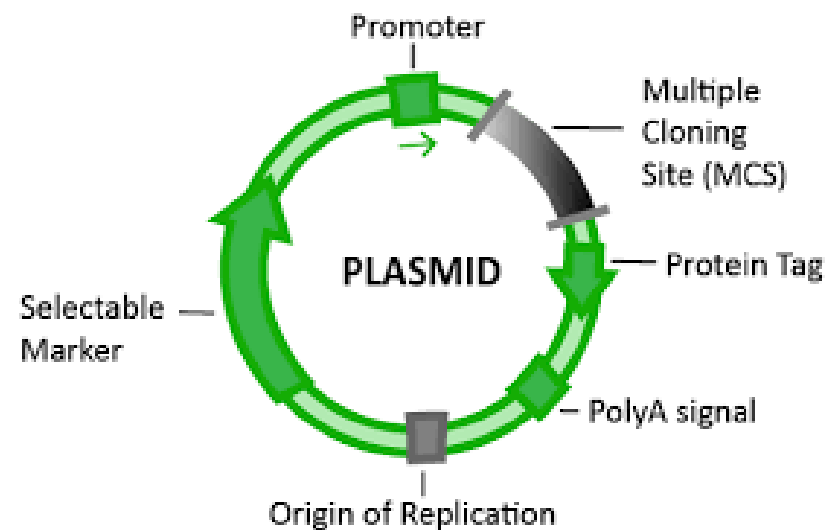
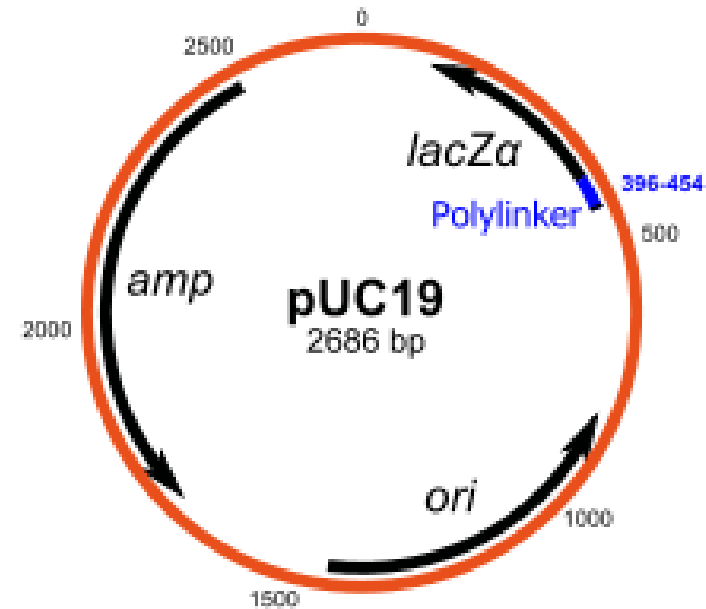
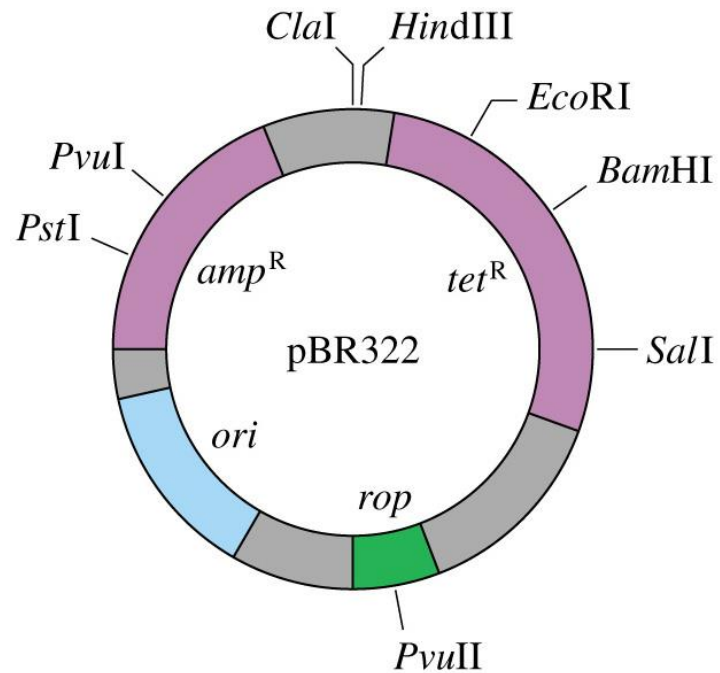


(B) JOINING TWO FRAGMENTS CUT BY DIFFERENT RESTRICTION NUCLEASES

Ligaza iz bakteriofaga T4 služi za povezivanje porezanih krajeva DNA



# Plazmidi pogodni za kloniranje

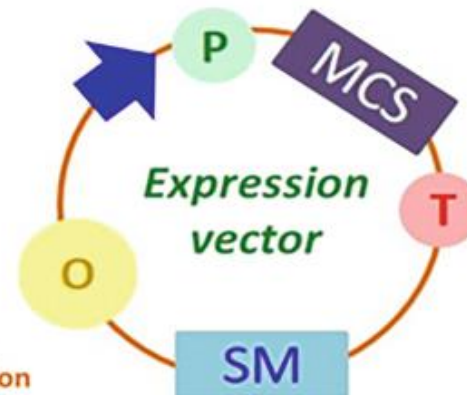
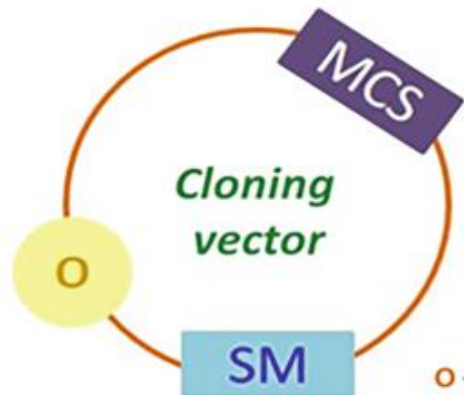


## Types of vectors

### Cloning vector

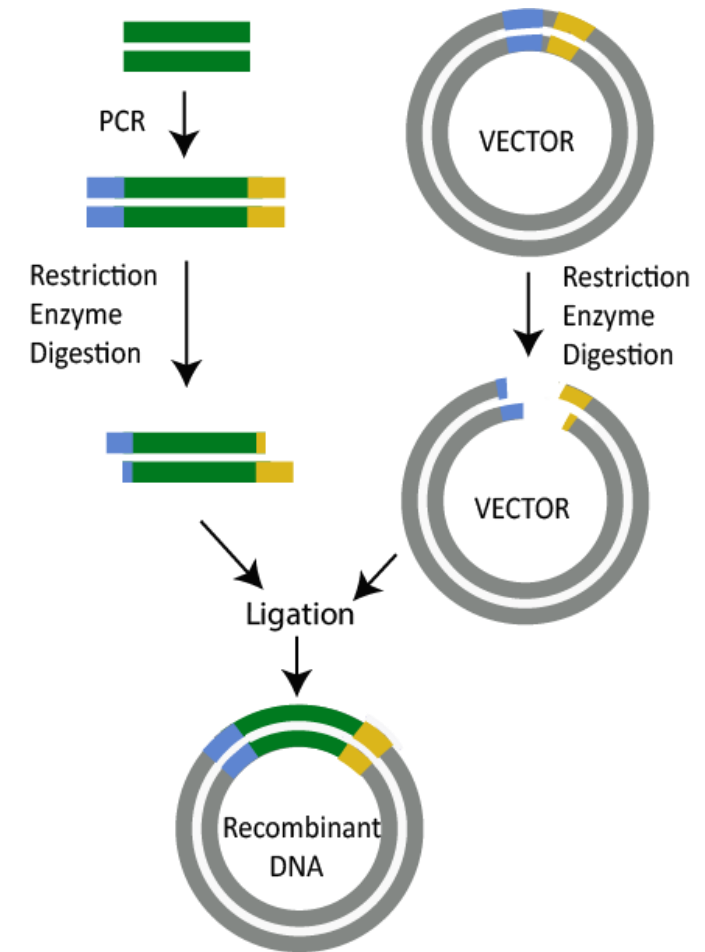
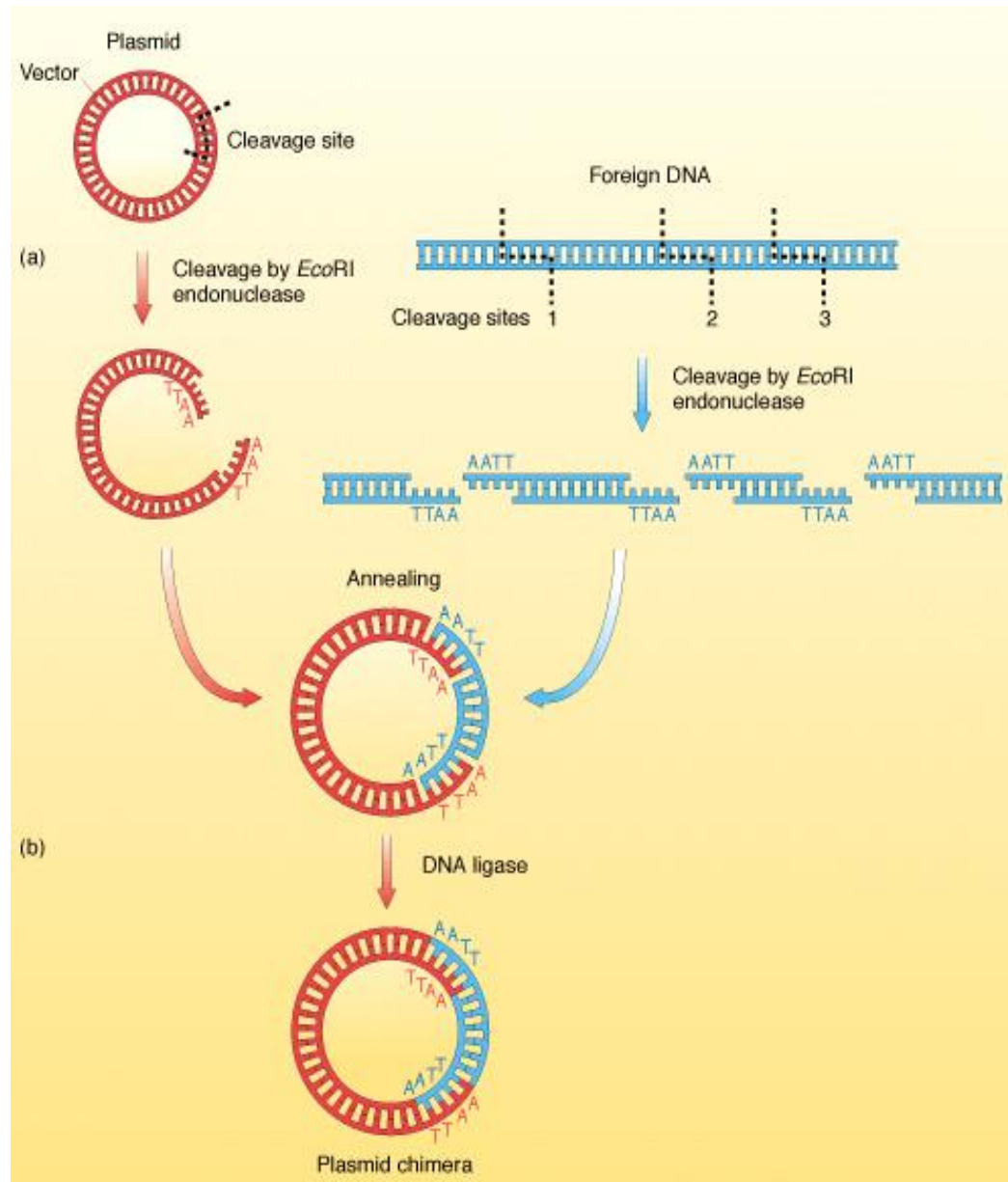
- Plasmid vector – pBR322, pUC18/19
- Cosmid vector - pJB8
- Phagemid vector – pEMBL8
- Bacteriophage vector – M13
- Artificial chromosome – PAC, BAC, YAC

### Expression vector



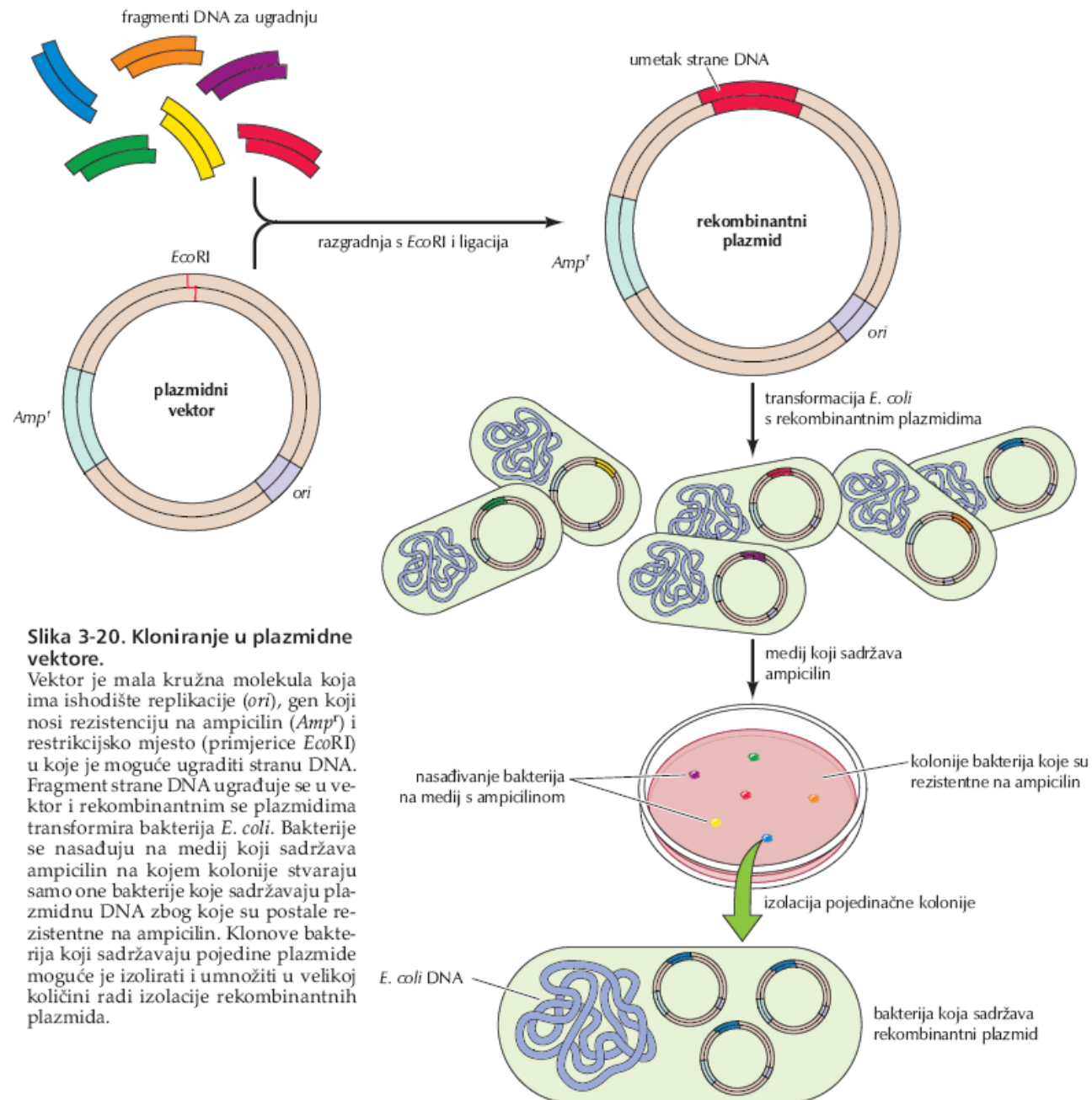
O – Origin of replication  
MCS – Multiple cloning sites  
SM – Selectable marker  
P – Promoter  
T - Terminator

# KLONIRANJE GENA U *E. coli*





- Ugrađena DNA u plazmidu se mora UNIJETI u bakteriju (**transformacija**)
- U bakteriji će doći do umnažanja plazmida (replikacije)  
**zašto?**
- Dodatak antibiotika osigurava da se selektiraju samo one bakterije koje su **primile plazmid**
- **Kako znamo da se primio insert?**
- Jednostavnom diobom dobivaju se **KLONOVI** od jedne početne stanice
- Klonirani gen se može eksprimirati i dati **PROTEIN**

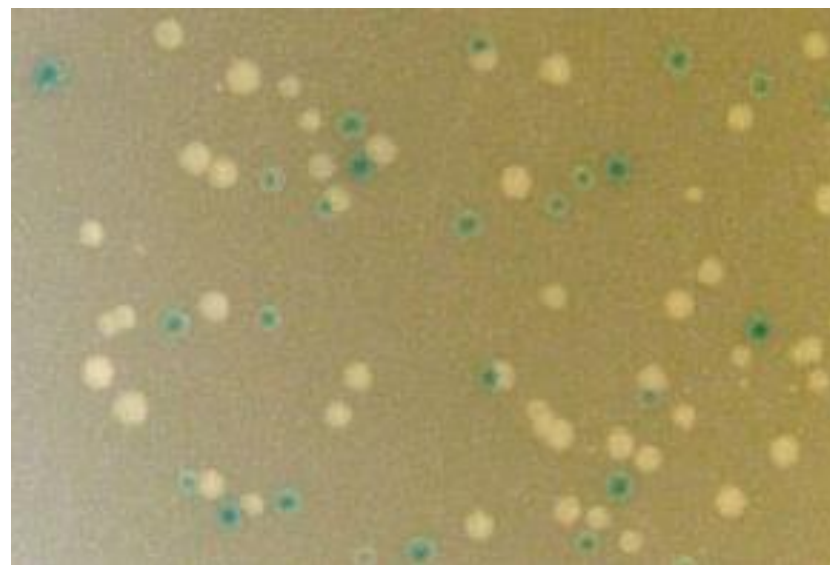
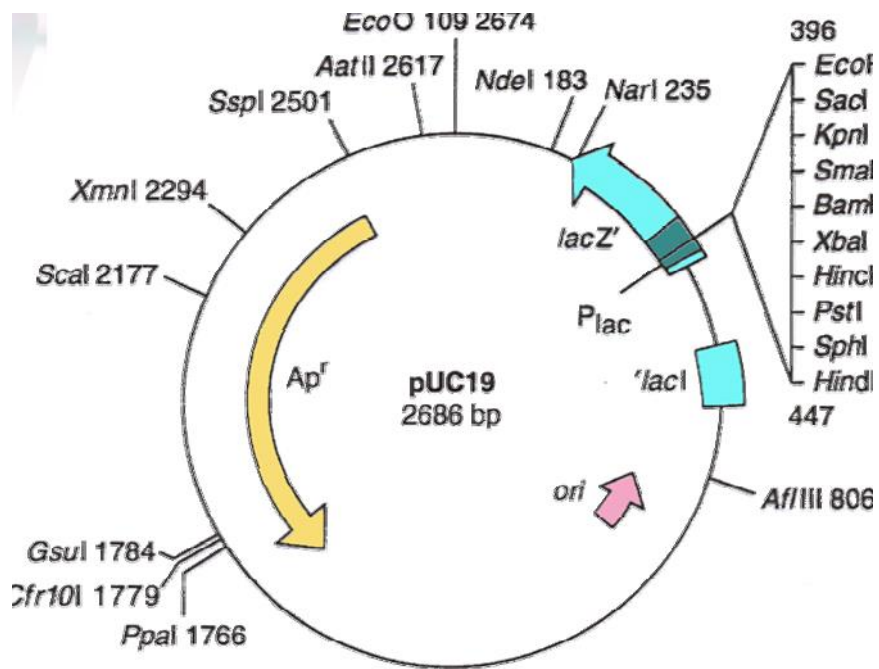


**Slika 3-20. Kloniranje u plazmidne vektore.**

Vektor je mala kružna molekula koja ima ishodište replikacije (*ori*), gen koji nosi rezistenciju na ampicilin (*Amp<sup>r</sup>*) i restrikcijsko mjesto (primjerice *EcoRI*) u koje je moguće ugraditi stranu DNA. Fragment strane DNA ugrađuje se u vektor i rekombinantnim se plazmidima transformira bakterija *E. coli*. Bakterije se nasadiju na medij koji sadrži ampicilin na kojem kolonije stvaraju samo one bakterije koje sadržavaju plazmidnu DNA zbog koje su postale rezistentne na ampicilin. Klonove bakterija koji sadržavaju pojedine plazmide moguće je izolirati i umnožiti u velikoj količini radi izolacije rekombinantnih plazmida.

# Pretraživanje klonova

Lac operon i/ili njegovi derivati koriste se kao geni **REPORTER** ili geni markeri u istraživanjima



+IPTG

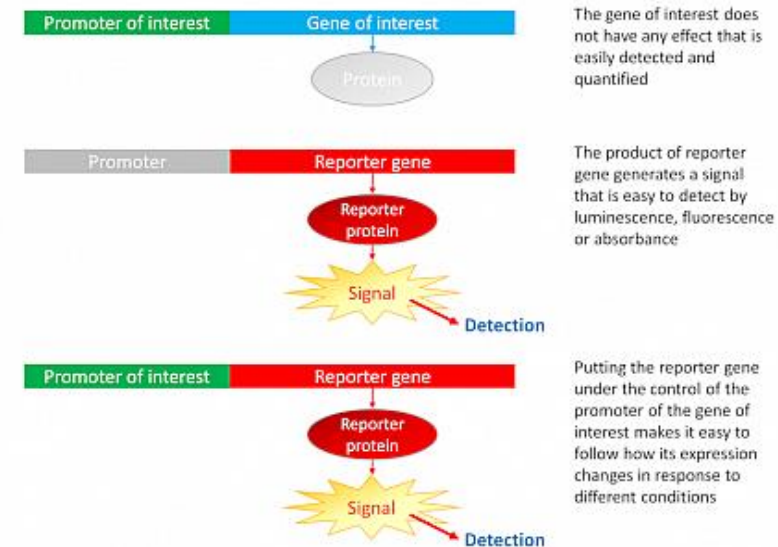
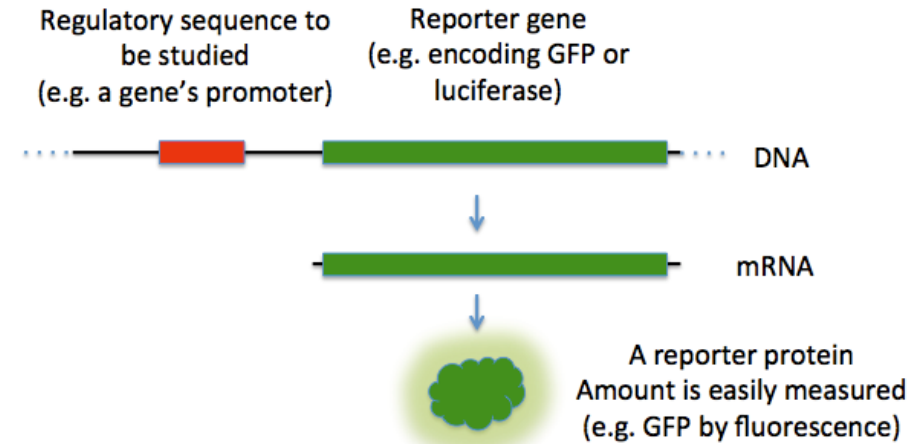
Plavo-bijele kolonije na podlozi s X-gal

Dakle, stanice koje su *lacZ*<sup>+</sup> u prisustvu X-gal su  
? boje

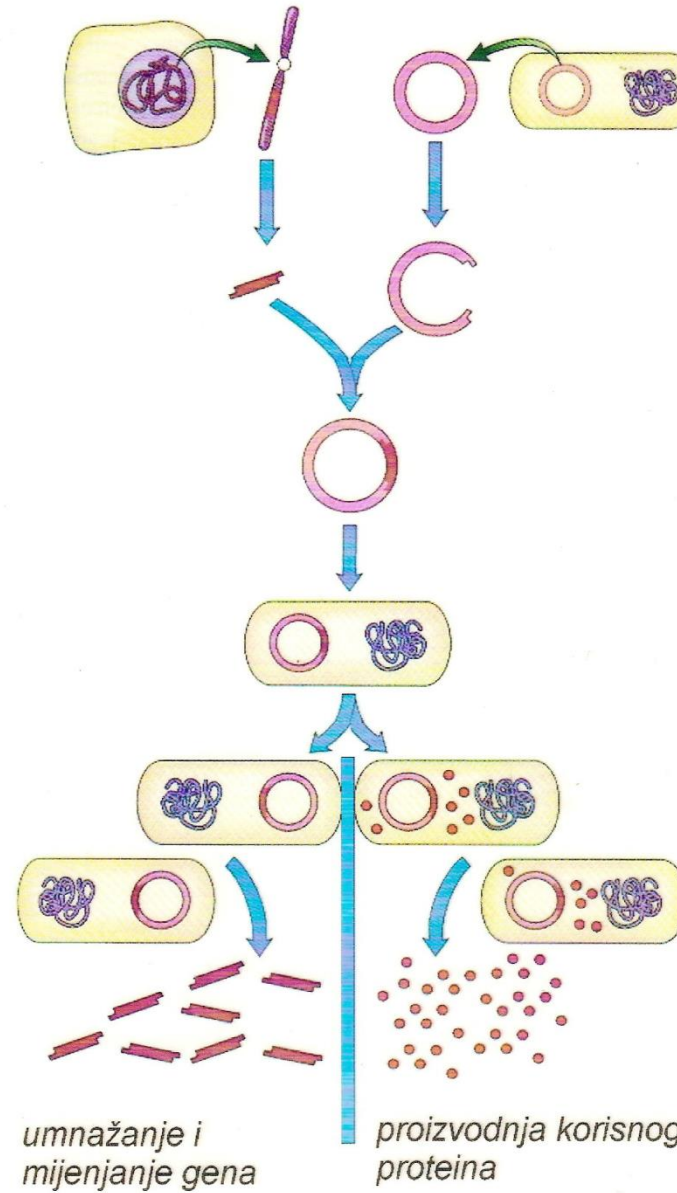


# Geni reporteri

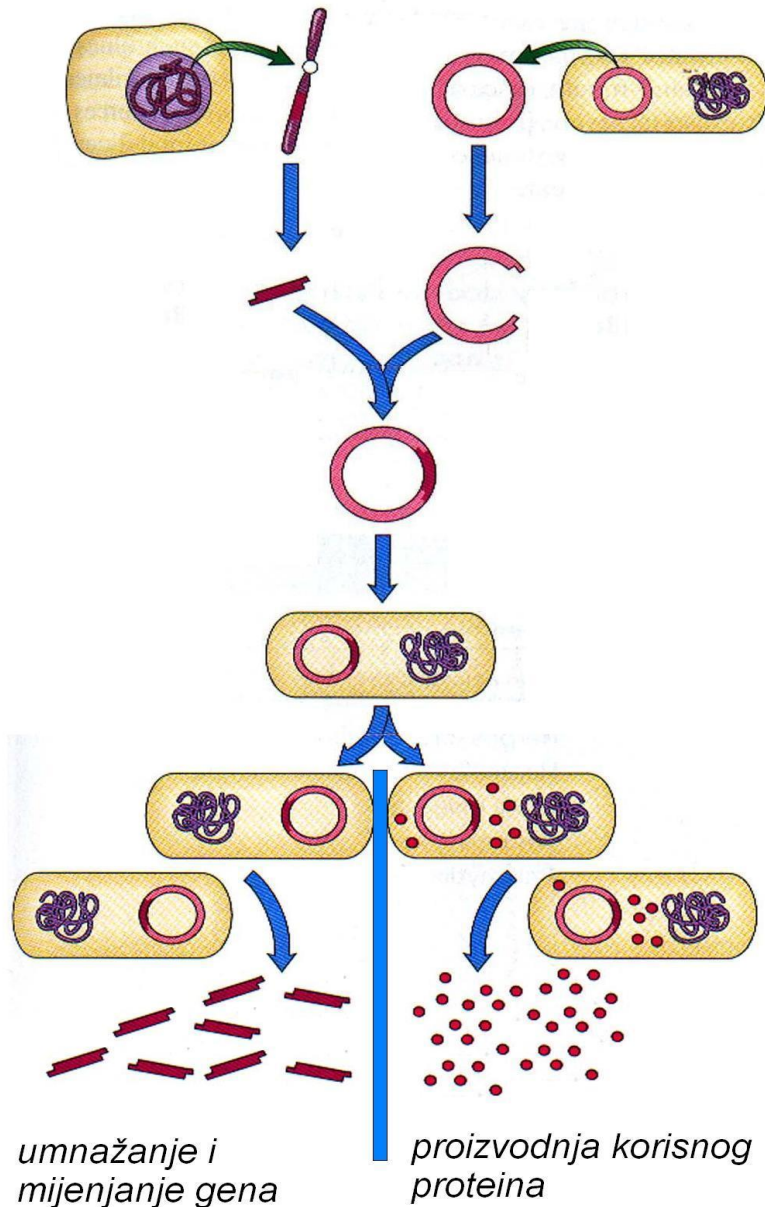
- Geni reporteri su geni čiji se produkti mogu lako otkriti i pratiti/mjeriti ili su selektivni marker
- Najčešće se gen reporter stavlja **iza** promotora (regulatorne regije) drugog gena od interesa u bakterijama, biljkama, staničnoj kulturi ili životinjama ili se napravi **fuzija dva gena**
- Tipični geni reporteri su:
  - Green fluorescent protein (GFP) iz meduze – svijetli zeleno pod plavim svjetlom
  - Enzim luciferaza – katalizira reakciju s luciferinom pri čemu nastane svjetlo (bioluminiscencija)



**Temeljna tehnika  
genetičkog inženjerstva i  
najjednostavniji način primjene**



*Temeljna tehnika  
genetičkog inženjerstva i  
najjednostavniji način primjene*



## Proizvodnja **proteina u bakterijama**

### Medicina (farmacija)

- cjepivo za hepatitis B
- hormon rasta
- interferon alfa-2a (leukemije, hepatitis C)
- interferon beta 1-B (multipla skleroza)
- lepirudin (antikoagulant)
- koagulacijski faktori VIII i IX (hemofilije A i B)
- dornaza alfa (cistična fibroza)
- gonadotropin (sterilnost)
- inzulin (šećerna bolest)
- agluceraza (Gaucher)
- darbepoetin alfa (anemija)
- alteplaza (infarkt, pl. embolija, ishemija)

### Prehrambena industrija

- kimozin
- lipaze
- riboflavin
- amilaze
- acetolaktat dehidrogenaza

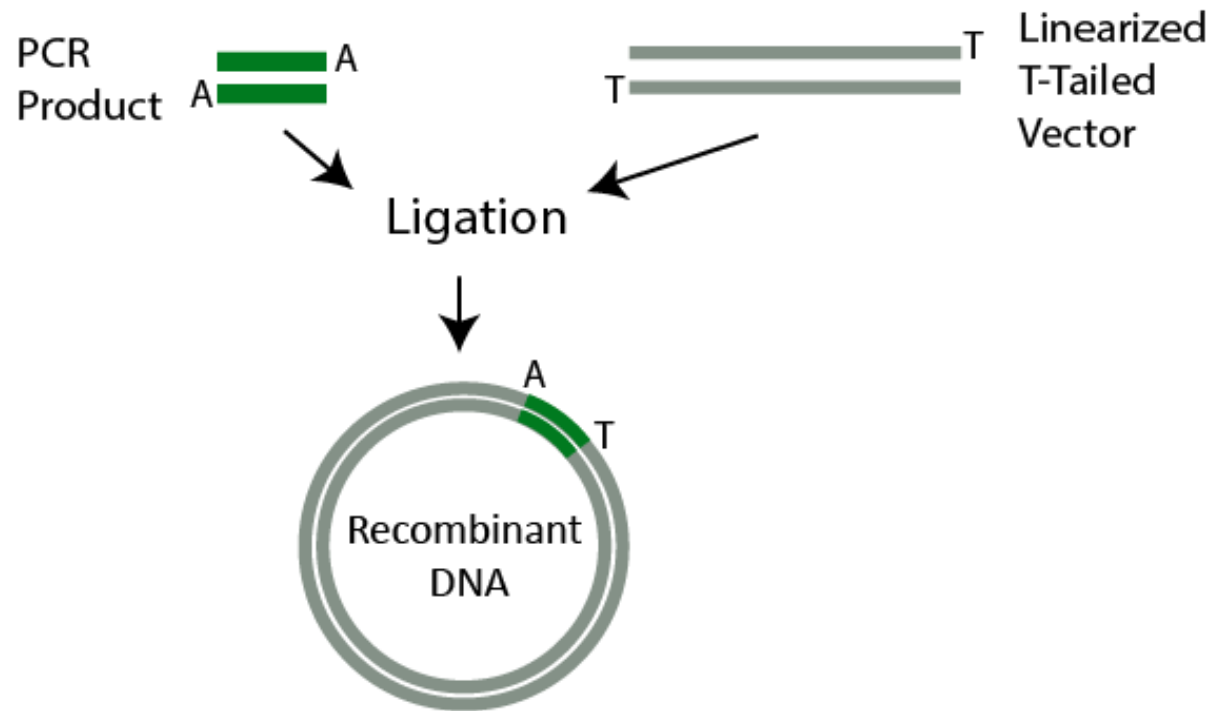


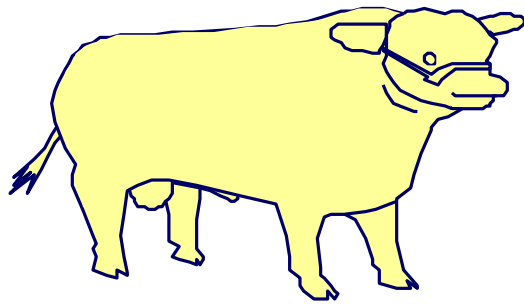
# Primjena kloniranja (gena)

- U istraživanjima
- Proizvodnji korisnih proteina za industriju i liječenje
- Genetička promjena biljaka ili životinja - **transgeni organizmi**
- Tehnologija može pomoći u razvoju novih terapija za liječenje bolesti - **genska terapija**
- Danas postoje mnoge druge verzije kloniranja za koje ne trebaju restriksijske endonukleaza i DNA ligaza

# Kloniranje PCR-om

- Koristi se kad restrikcijski enzimi nisu kompatibilni ili se ne poznaje sekvenca ciljnog gena ili su restrikcijska mjesta unutar inserta (**vektor za kloniranje**)
- Mana - potrebni posebni vektori za kloniranje koji imaju T-krajeve (koji su linearizirani) i **nemaju** promotor za istraživanje uloge kloniranih gena
- DNA polimeraza dodaje A na 3' kraju (krajevi s A)





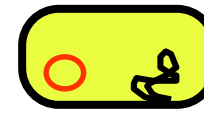
Iz goveda  
(ili svinja)  
3150

Ekstrakcija  
1500 L

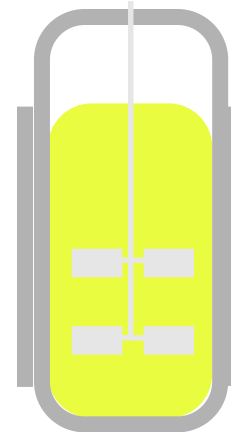
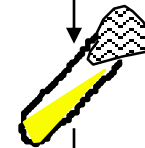


41,6 g inzulina

2 500 ampula



*E. coli*  
s genom za  
ljudski inzulin

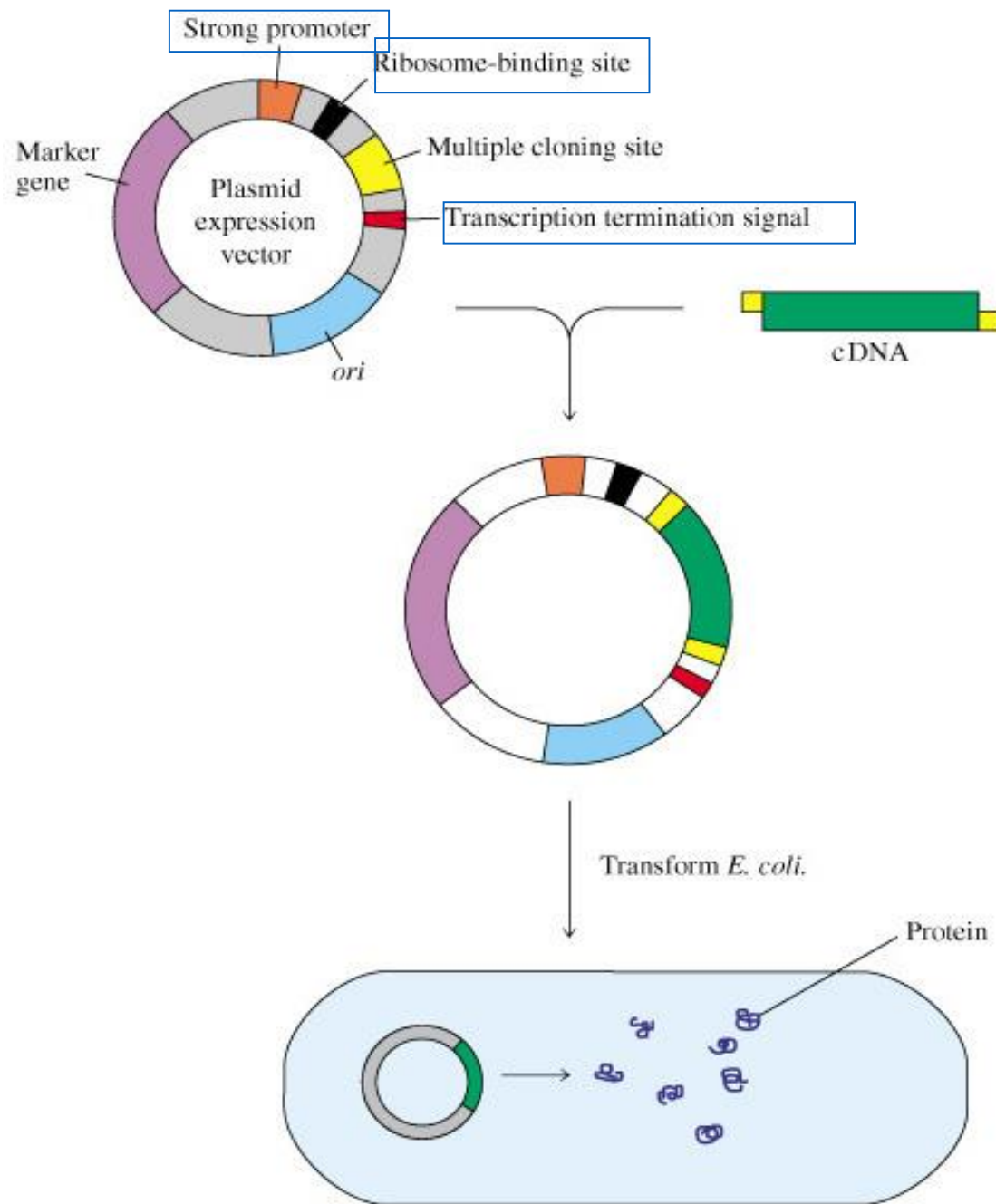


bioreaktor

826 L podloge

41,6 g inzulina

2 500 ampula



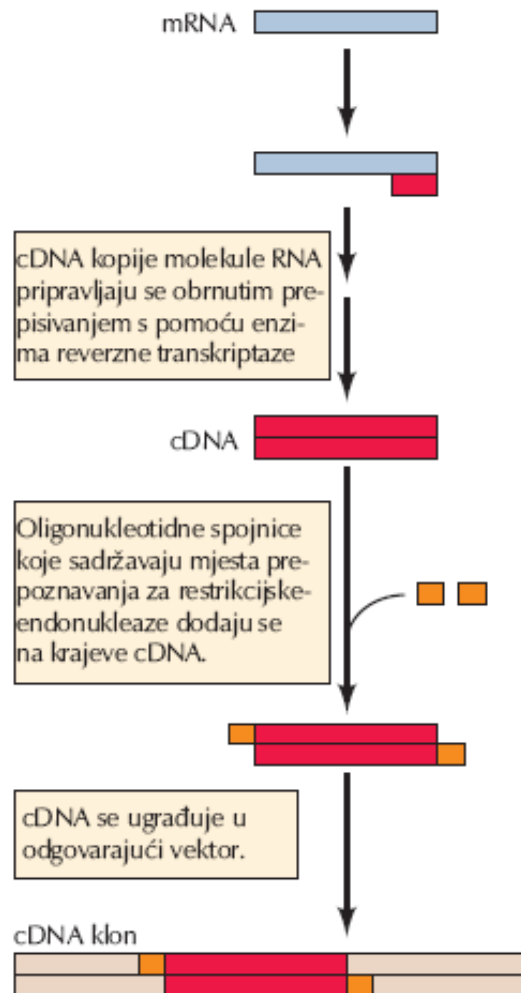
Za proizvodnju  
**eukariotskih**  
**proteina** u

bakterijama  
potrebne su dodatne  
obrade gena:

- 1) Gen ne smije imati  
**introne (!)**
- 2) Ispred gena treba  
ugraditi **prokariotski**  
promotor
- 3) Terminator
- 4) Optimizacija kodona?



# Kloniranje RNA



Slika 3-18. Kloniranje cDNA.

Prvo je potrebno prevesti molekulu mRNA u **cDNA (komplementarna DNA)**

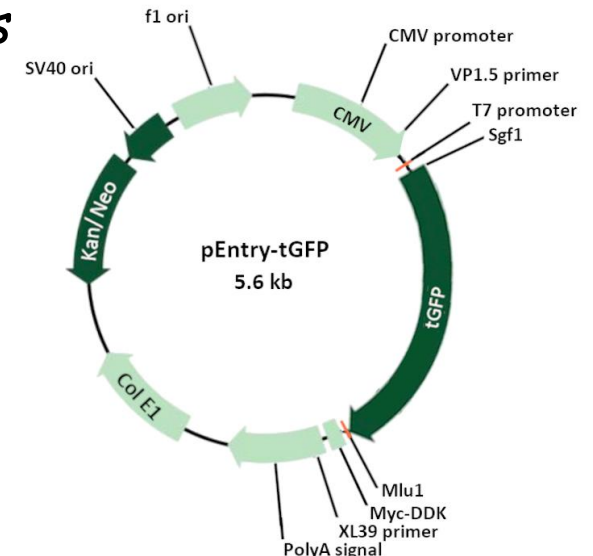
Najčešće se koristi poli-dT početnica i reverzna transkriptaza iz retrovirusa

Zatim nastaviti kao kloniranje s DNA

Po čemu se cDNA razlikuje od genomske DNA kod eukariota?

# Eukariotski vektori (plazmidi)

- Eukariotski vektori često imaju **dva ori-ja**, jedan bakterijski (npr. ColE1) i jedan virusni (npr. SV40).
- Bakterijski ori služi za umnažanje plazmida u bakterijama prije **transfekcije**, a virusni za **episomalno** umnažanje u eukariotskoj stanici domaćinu.
- Za različite organizme postoje različiti vektori (plazmidi), za kvasce, insekte, biljke, animalne i ljudske stanice
- Kod kvasca su selektivni geni u pravilu nutritivni (URA3, HIS3, LEU2, TRP1), plazmidi mogu biti samostalni ili se mogu ugraditi u genom
- Kod biljaka poznat plazmid Ti iz bakterije *Agrobacterium tumefaciens*



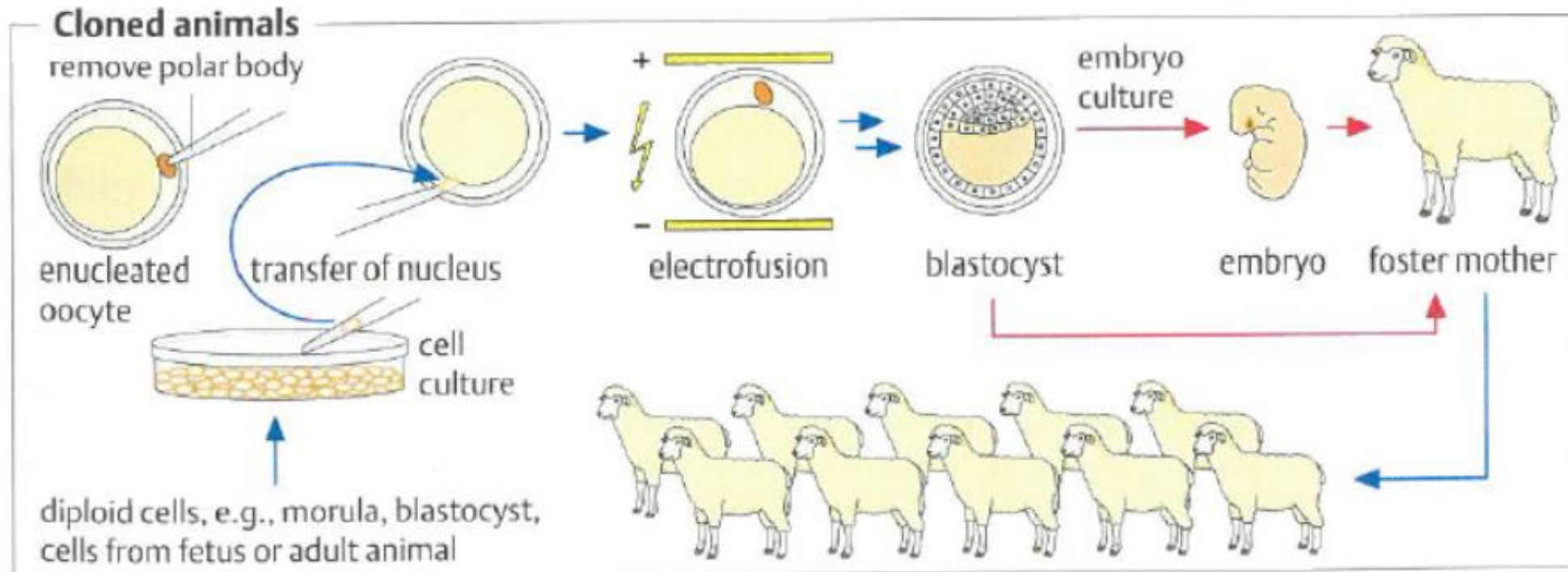
# Genomsko (terapeutsko) kloniranje - ovca Dolly

- Prvi klonirani sisavac iz somatske stanice koristeći metodu **prijenos jezgre - unos jezgre somatske stanice u jajnu stanicu bez jezgre**
- Ovca Dolly su klonirali Keith Campbell i **Ian Wilmut** sa instituta Roslin, dio Sveučilišta u Edinburghu i biotehnološke kompanije PPL Therapeutics
- Ovca Dolly je rođena 05. 07. 1996. i eutanzirana 2003. pet mjeseci prije sedmog rođendana jer je patila od bolesti pluća. Smatra se da bolest nije povezana s kloniranjem
- Donorske stanice jezgre bile su iz stanica mliječnih žlijezda i mogućnost stvaranja cijelog organizma je dokaz da je moguće stvoriti zdrav organizam iz već diferencirane stanice



# Ovca Dolly

- U pokusu je bilo 277 (neoplođena) jajnih stanica i 27 dobivenih embrija iz njih
- Samo je Dolly doživjela starost
- Metoda je u međuvremenu poboljšana i danas se koristi za stvaranje stoke za produkciju terpautskih proteina („gene farming“), trkaćih konja, očuvanje ugroženih vrsta...

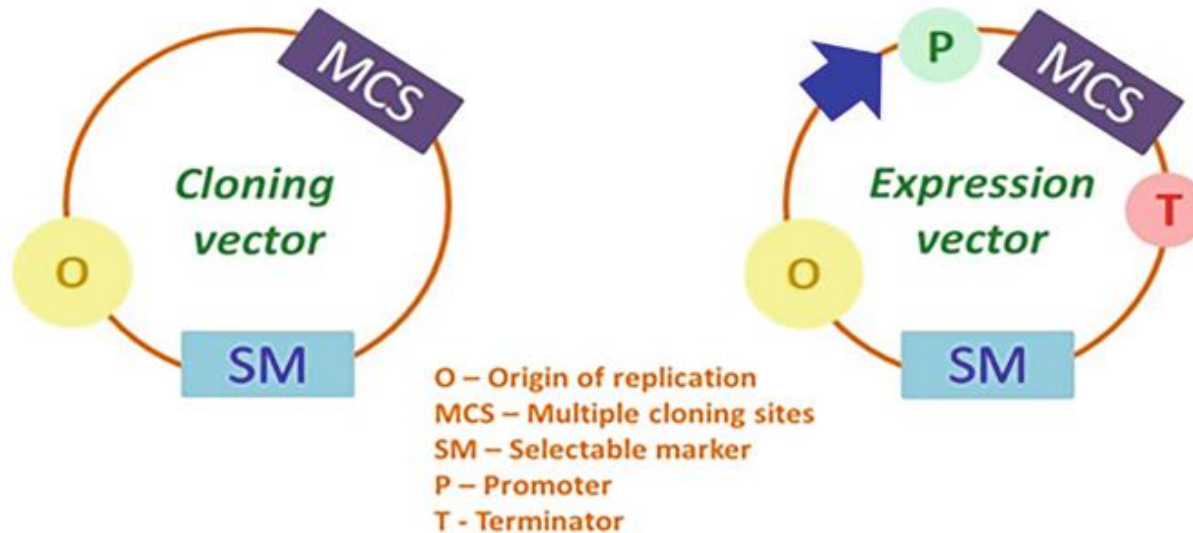


## Types of vectors

### Cloning vector

- Plasmid vector – pBR322, pUC18/19
- Cosmid vector - pJB8
- Phagemid vector – pEMBL8
- Bacteriophage vector – M13
- Artificial chromosome – PAC, BAC, YAC

### Expression vector

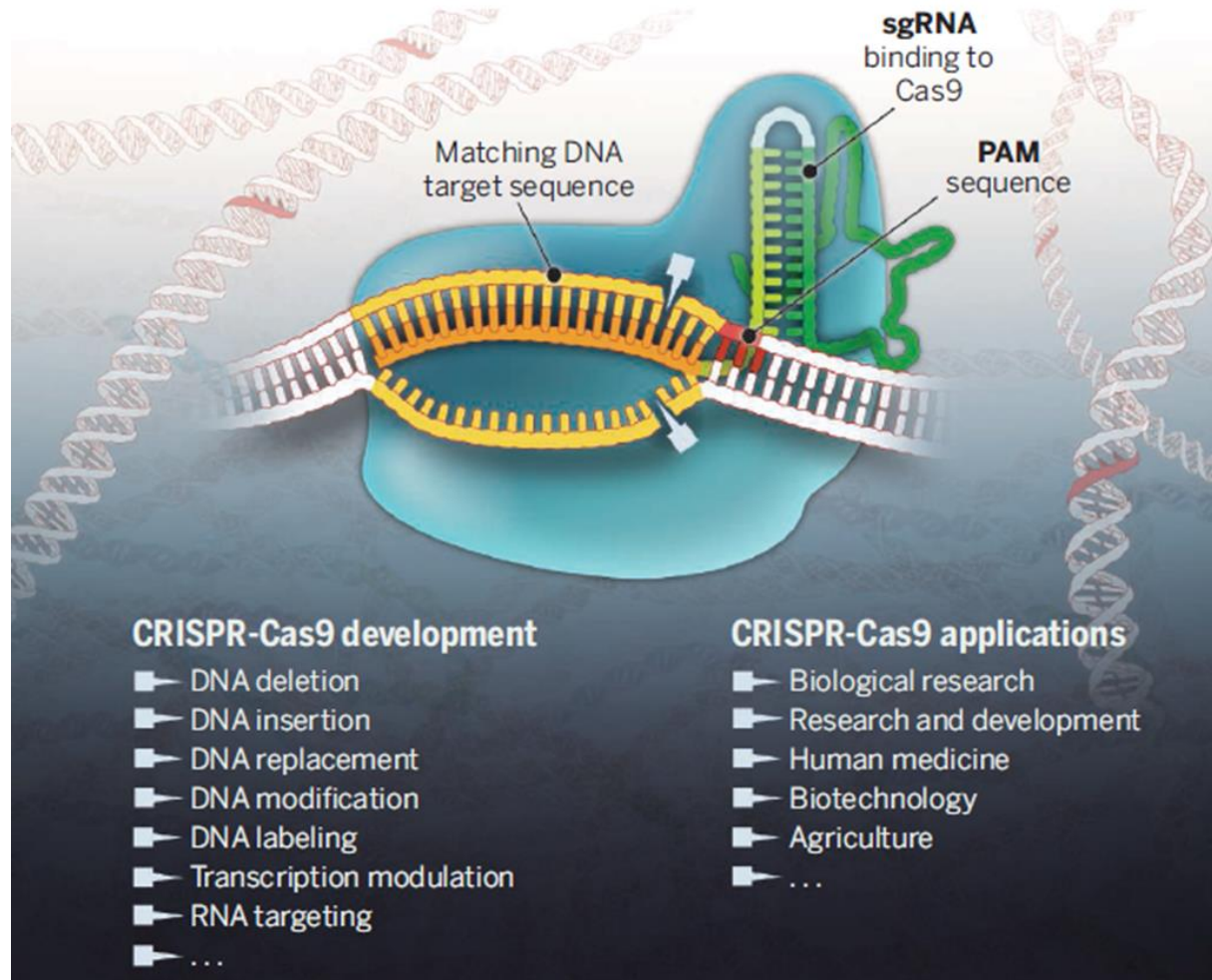


PAUZA

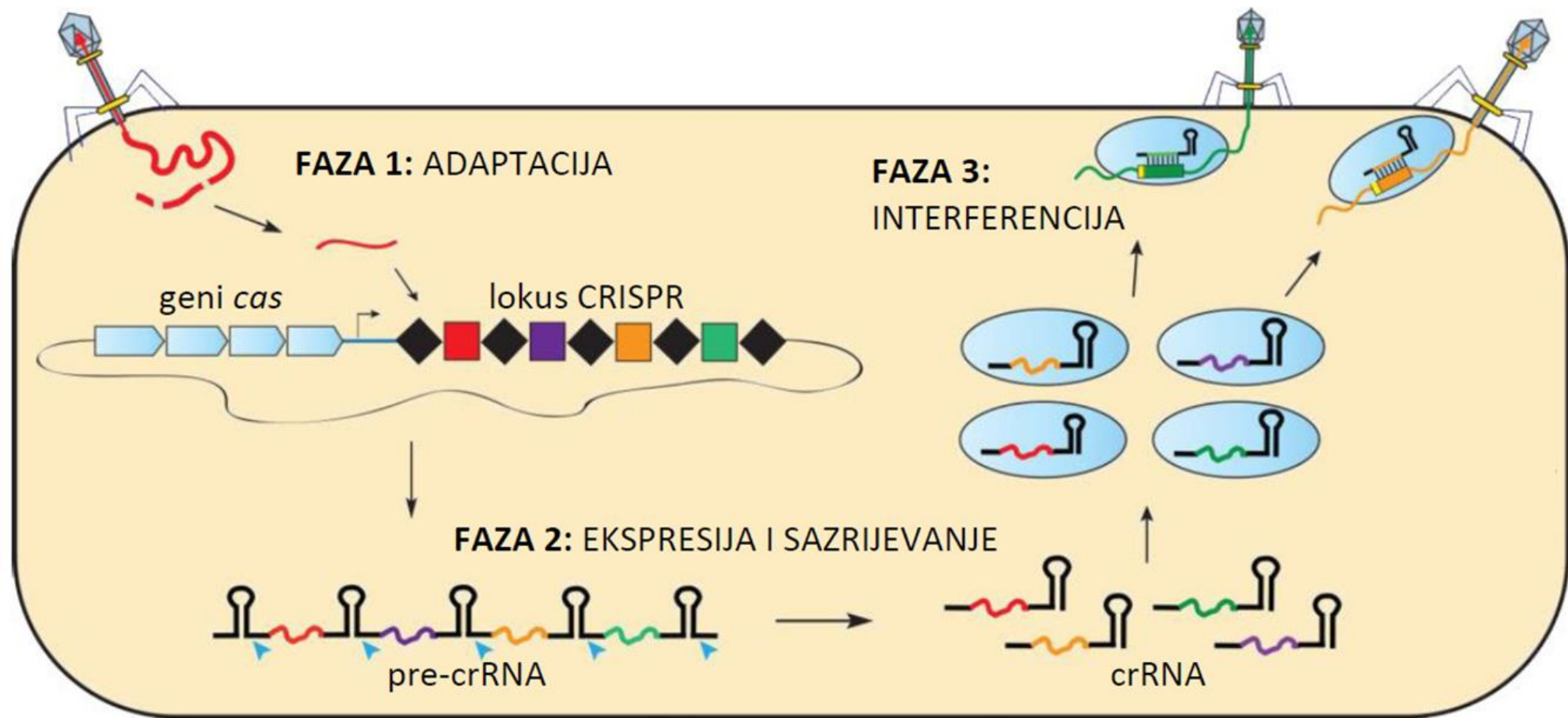


# Tehnologija CRISPR/Cas9 - uređivanje genoma

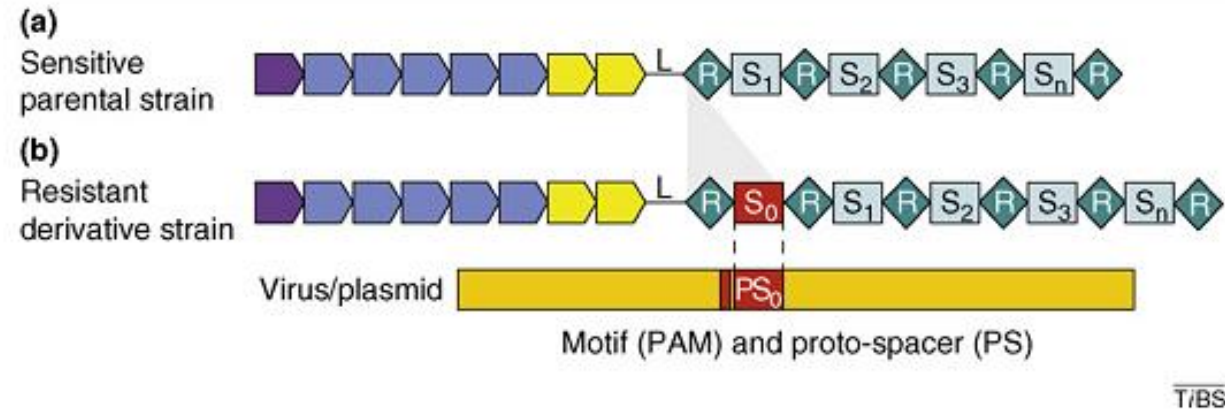
CRISPR = clustered regularly interspaced short palindromic repeats



# Zaštita bakterija sustavom CRISPR-Cas

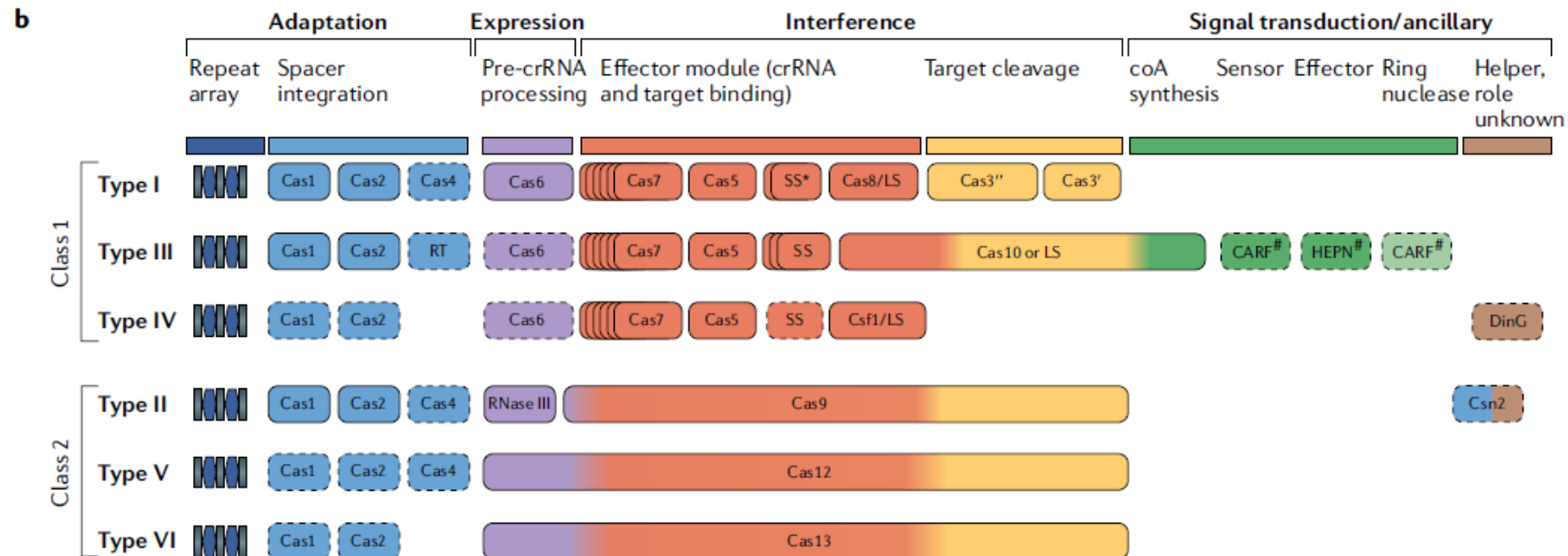
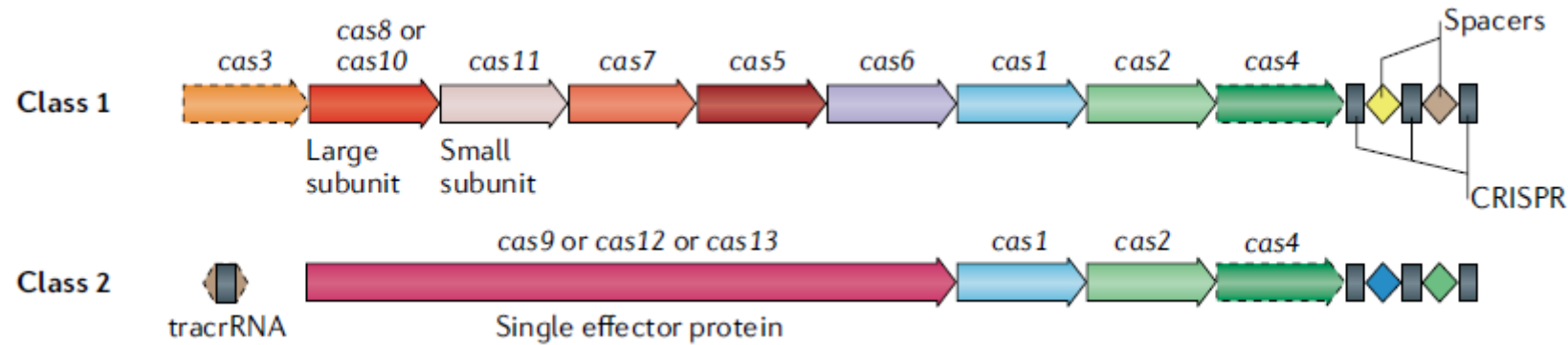


# Sustav CRISPR-Cas

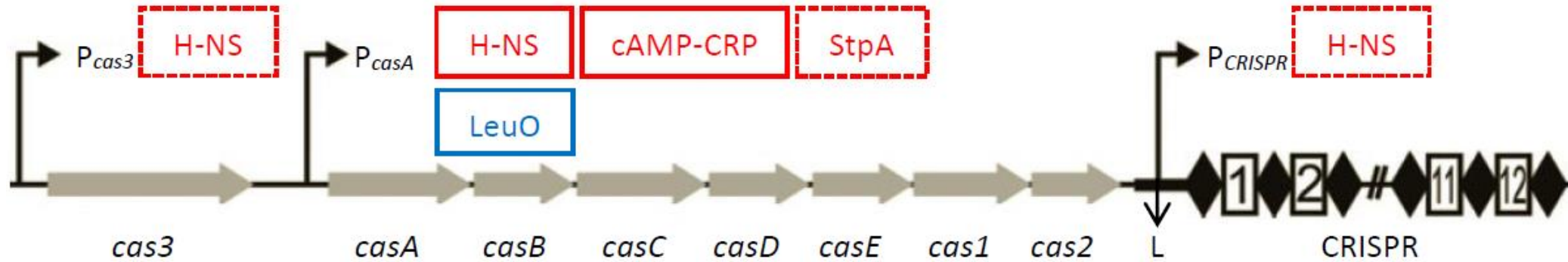


- a) građa lokusa CRISPR-Cas osjetljivog soja
- b) infekcija stranom DNA ponekad može dovesti do ugradnje nove razmaknice ( $S_0$ ) koja je dio invadirajuće DNA. Prije ugradnje razmaknica se naziva **proto-razmaknica** ( $PS_0$ ) i sadrži motiv **PAM** (proto-spacer adjacent motif). **Motiv PAM je važan i za izbor nove razmaknice i za cijepanje (interferenciju) strane DNA**

# Podjela sustava CRISPR-Cas

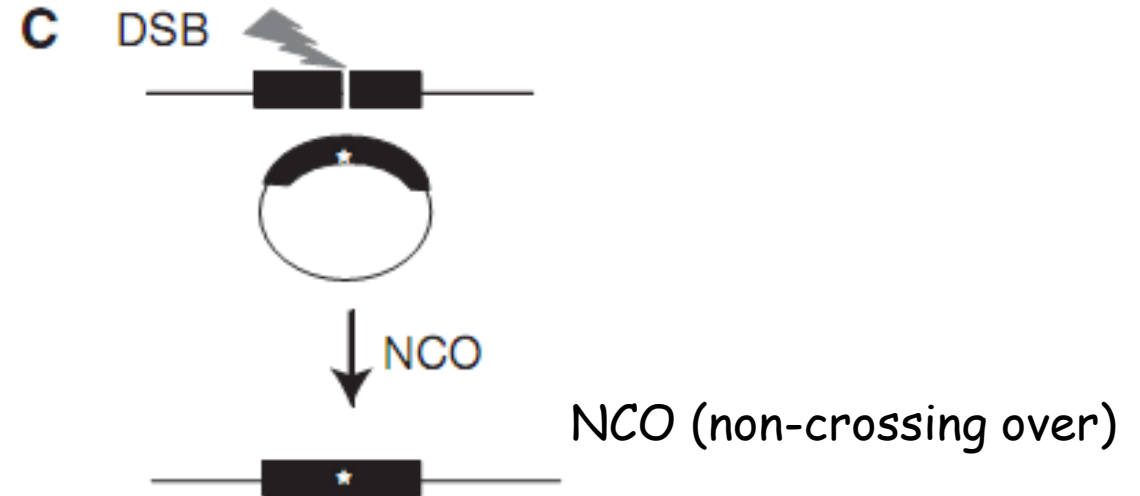
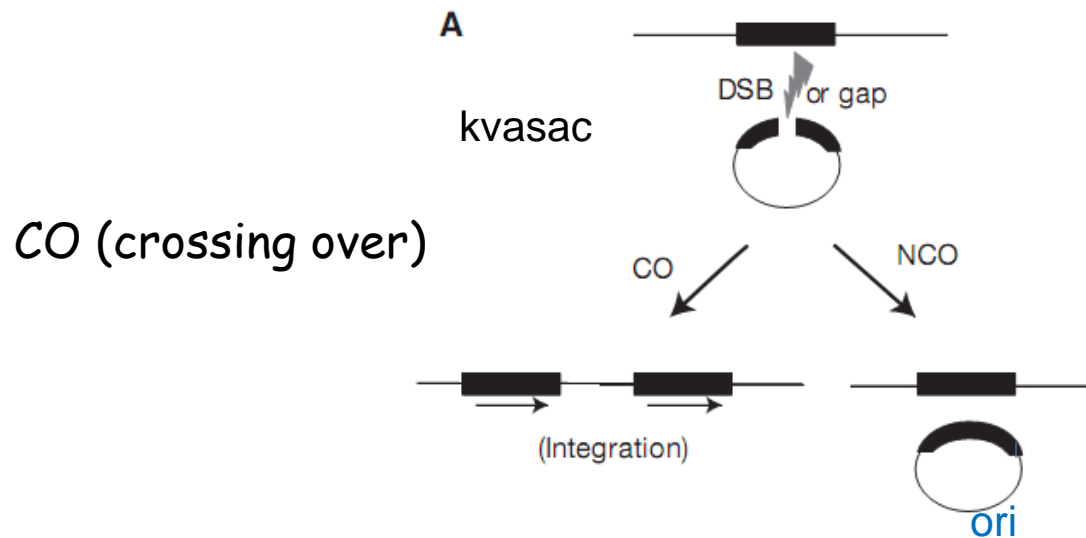


# Sustav CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* K-12





# Kako napraviti željene promjenu u živom organizmu (u sisavcima)?

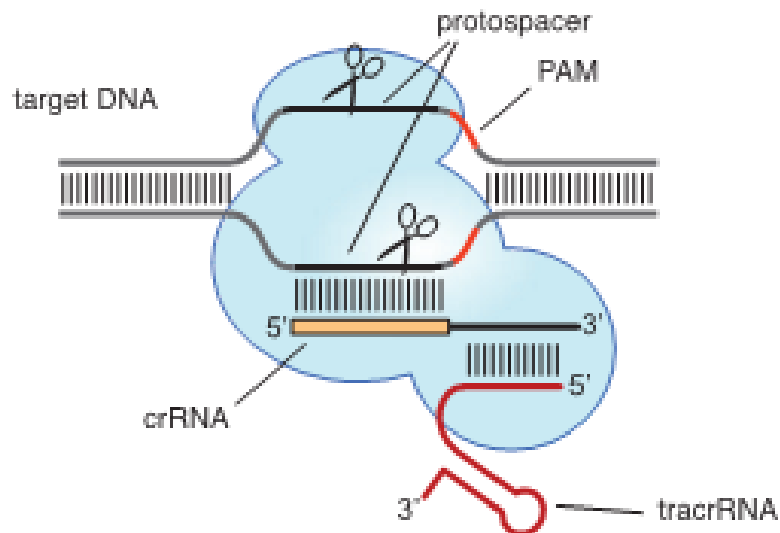


Ono što je potrebno je **uvesti lom u kromosom!**

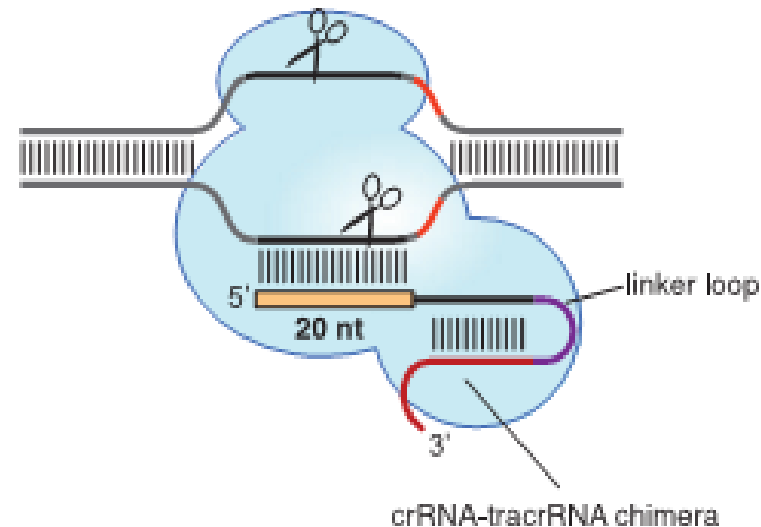
- Ideja o mijenjanju kromosoma sisavaca koristeći popravak dvolančanog loma (DSB) homolognom rekombinacijom došla je od otkrića da **dvolančani lom u plazmidima** može inducirati **rekombinaciju** s kromosomom

# Prenamjena obrambenog mehanizma bakterija u alat za istraživanja u molekularnoj biologiji

U bakteriji: Cas9 usmjeren s dupleksom crRNA:tracrRNA pronalazi stranu DNA



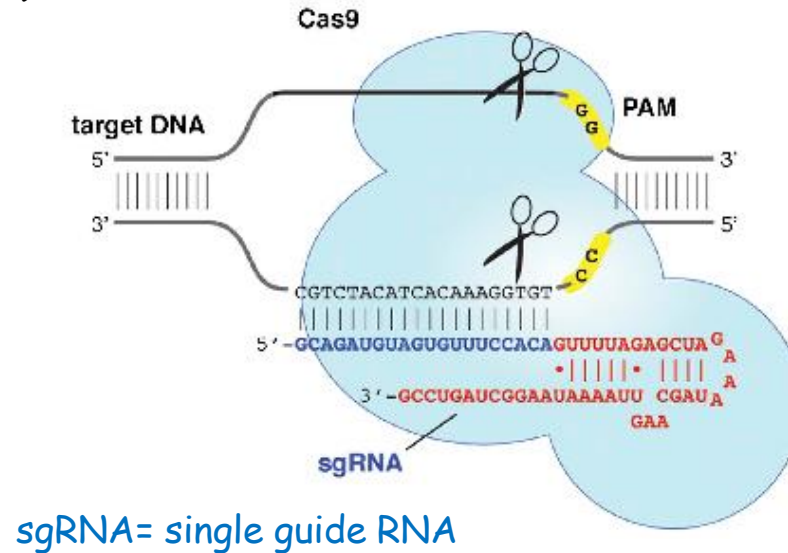
Kao alat: Cas9 usmjeren s jedinstvenom kimernom RNA pronalazi gdje mi to želimo



# Upotreba CRISPR-Cas9 alata

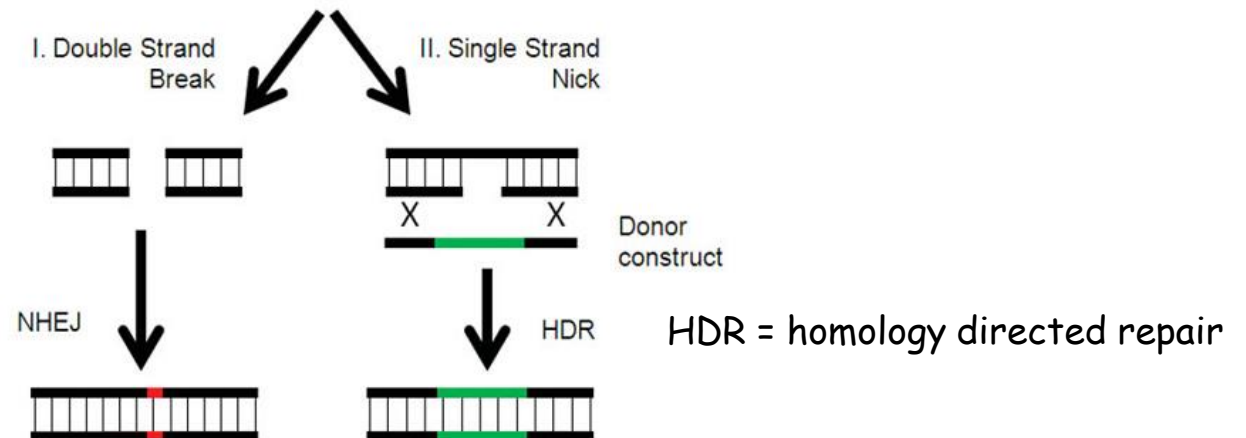


Cas9 iz *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) ima 1368 ak

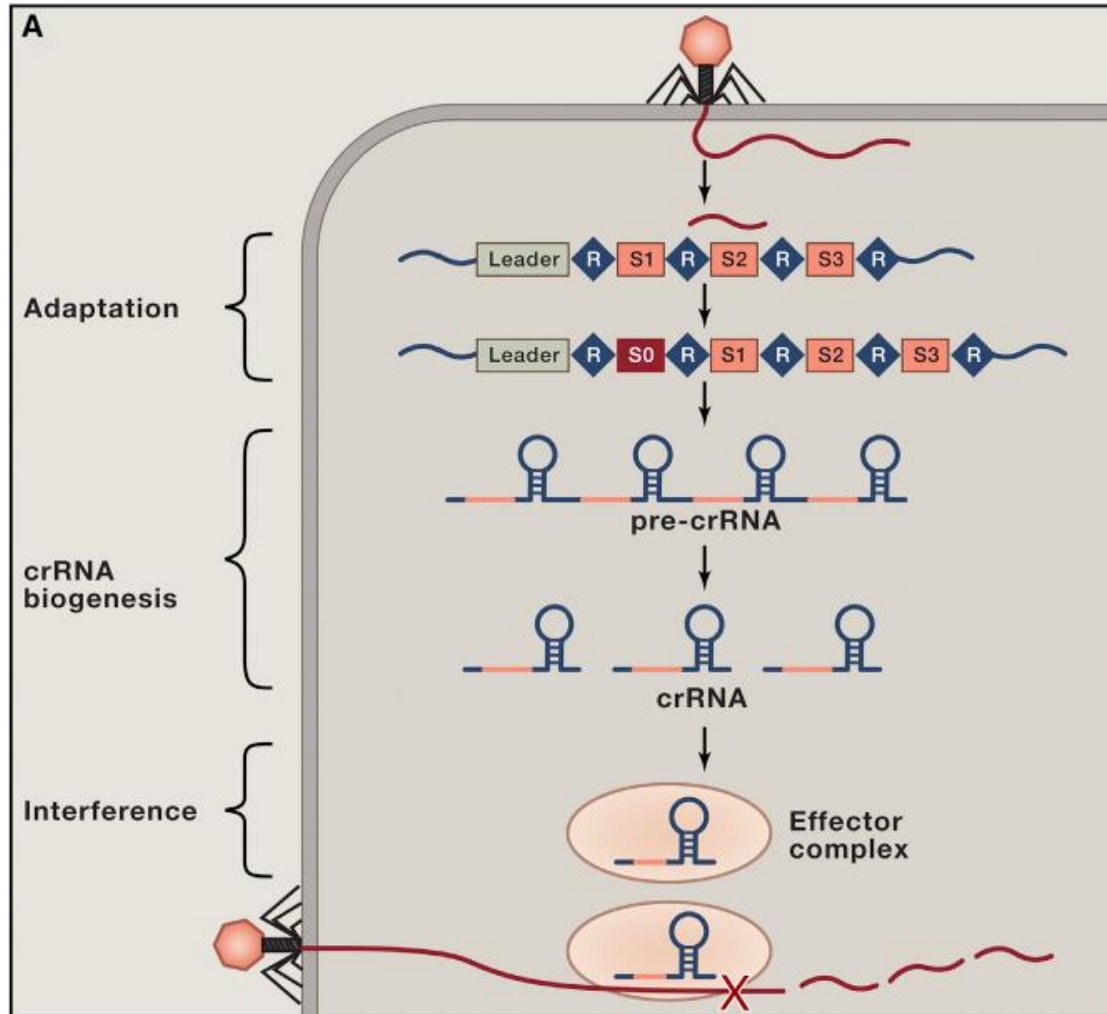


Uz pomoć odabrane **sgRNA** (oko 20 pb) može se uvesti dvolančani lom bilo gdje u genomu - ili će se popraviti NHEJ ili homolognom rekombinacijom

sgRNA= single guide RNA



# Normalna vs primjena sustava CRISPR-Cas



- Bakterije imaju **lokus CRISPR** gdje se nalaze **crRNA** (fragmenti strane DNA)
- U metodi znanstvenik **dizajnira** sgRNA!
- Bakterije imaju gene koji kodiraju za proteine Cas, u njima se translatiraju
- U metodi se **protein Cas9** ili **ubacuje** ili se klonira u vektor i unosi u stanice
- Bakterija napada stranu DNA
- U metodi se cijepa genomska DNA domaćina

Za uspjeh zaštite ili metode MORA se paziti na motiv **PAM** ispred mjesta prepoznavanja/cijepanja

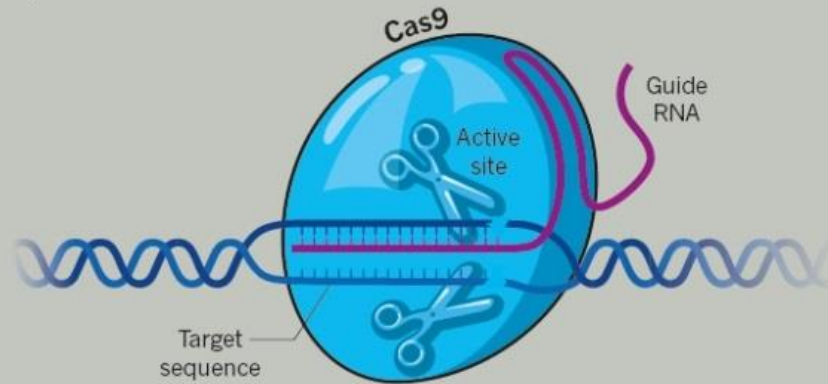
Efikasnost metode ovisi o efikasnosti unosa sustava u stanicu i reparatornih enzima domaćina

# HACKING CRISPR

By modifying the molecular machinery that powers CRISPR–Cas9 gene editing, scientists can probe the functions of genes and gene regulators with unprecedented specificity.

## Snip snip here

There are two main components of CRISPR–Cas9: the Cas9 enzyme, which cuts DNA, and a snippet of RNA that guides these molecular scissors to the sequence that scientists want to cut.

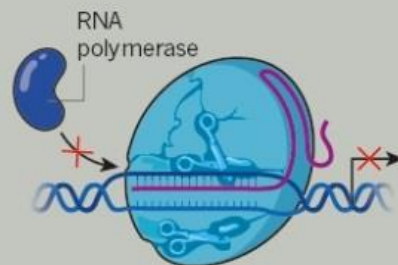


## Broken scissors

The Cas9 enzyme can be broken so that it no longer cuts DNA. But with the right guide RNA, it can still attach to specific parts of the genome.

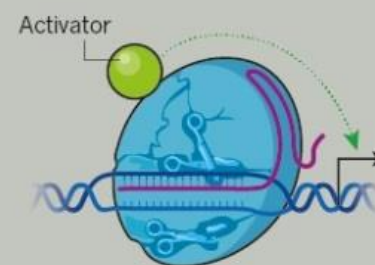
### CRISPR inhibition

A broken, or 'dead', Cas9 enzyme will block the binding of other proteins, such as RNA polymerase, needed to express a gene.



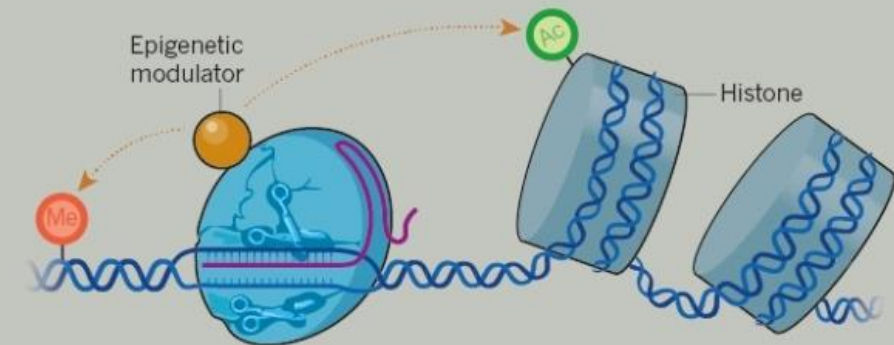
### CRISPR activation

An activating protein can be attached to a dead Cas9 protein to stimulate expression of a specific gene.



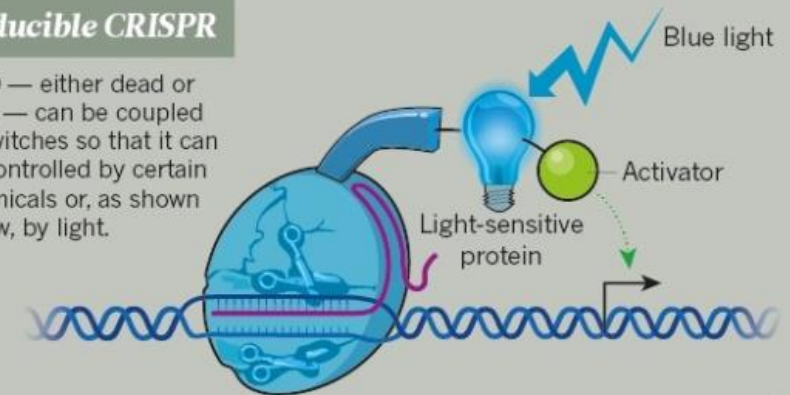
## CRISPR epigenetics

A broken Cas9 enzyme can be coupled to epigenetic modifiers, such as those that add methyl groups (Me) to DNA or acetyl groups (Ac) to histone proteins. This will allow researchers to study how precisely placed modifications affect gene expression and DNA dynamics.



## Inducible CRISPR

Cas9 — either dead or alive — can be coupled to switches so that it can be controlled by certain chemicals or, as shown below, by light.

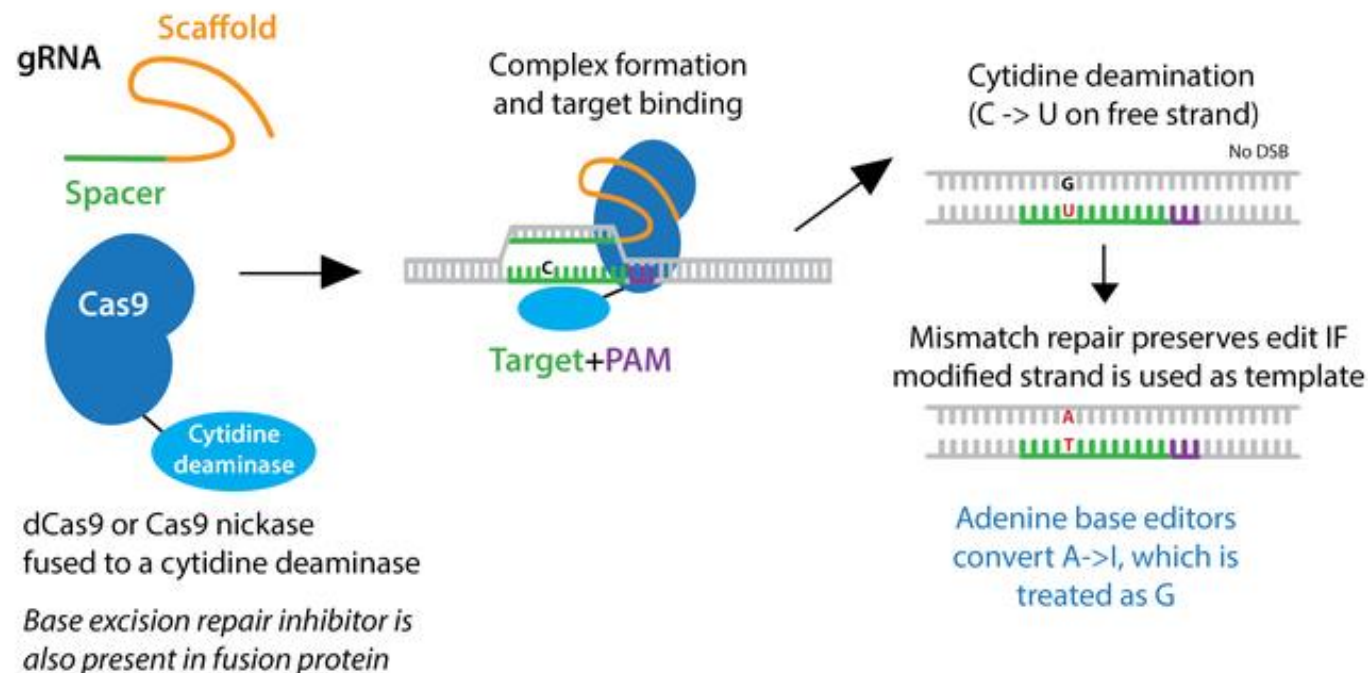




# Base editors (uređivači baza)

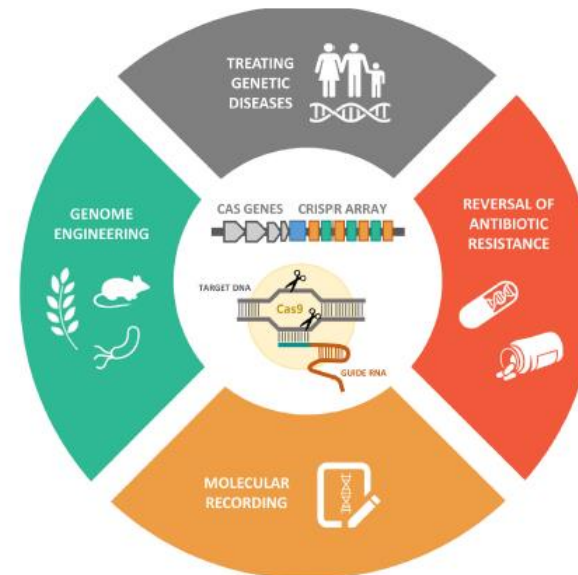
„Cutting a double helix to silence a gene, however, did not solve the problem of the many genetic diseases that need a computer-like “find and replace” solution”

David Lui, prof. kemije i kemijske biologije, direktor Merkin Institute of Transformative Technologies in Healthcare na Harvard University



# Primjena sustava CRISPR-Cas

- 1. genotipizacija bakterija - određivanjem razmaknica može se pratiti evolucija soja i sastav populacija
- 2. imunizacija bakterija - ili prirodno ili inženjerstvom mogu se napraviti bakterije imune na različite fage ili spriječiti unos plazmida s genima na otpornost na antibiotike - prvi patentni su bili za ovu primjenu i veliki broj komercijalnih „starter“ bakterija su imunizirane
- 3. uređivanje genoma - CRISPR-Cas9
- 4. bolja proizvodnja hrane
- 5. zaštita od nametnika (komarci)
- 6. modeli bolesti
- 7. sprječavanje izumiranja vrsta...



# Tip intervencija u genom

- Treba se razlikovati dva tipa korekcija u genomu: „genetička korekcija“ i „genetičko poboljšanje“ (genetic enhancement)
- **Genetička korekcija** podrazumijeva ispravljanje rijetkih mutacija (s visokom penetracijom što može dovesti do bolesti) u sekvencu koja se nalazi u većine ljudi. *To se može riješiti i na neki drugi način - koji?*
- **Genetičko poboljšanje** podrazumijeva šire djelovanje s ciljem „unaprjeđenja“ jedinki i vrste - to može biti od ispravljanja određenih mutacija do dodavanja novih osobina
- Kliničko uređivanje genoma imalo bi veliki utjecaj na čovječanstvo - tu će se društva i države morati dogovoriti gdje je granica koja će se povući i neće smjeti prijeći

**Are designer babies on the way?**

# Primjena tehnologije CRISPR-Cas u liječenju ljudi

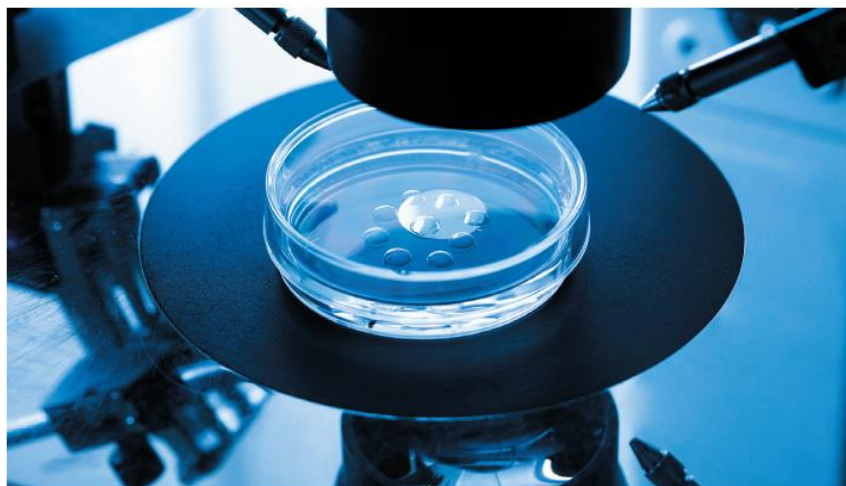
- 7000 različitih mutacija odgovorno je za rijetke genetske bolesti u ljudi
- Dovoljno je promijeniti 20 -30% tkiva da bi se izliječila genetska bolest
- Ipak, ovom metodom nije moguće liječiti tumore i zarazne bolesti
- US Food and Drug Administration dozvolila je 2021 korištenje CRISPR-Cas9 u kliničkim pokusima na ljudima za liječenje srpaste anemije, beta talasemije, leukemije, HIV, dijabetesa tipa 1...
- Rezultati kliničkih ispitivanja na srpastoj anemiji i beta talasemiji su obećavajući
- Problemi: skupo, za svaku bolest individualan pristup, off-target efekti

# CRISPR bebe i moratorij

- Unatoč problemima oko same metode i preporukama da se embriji ne modificiraju, u **studenom 2018.** su u Kini rođene **dvije blizanke Lulu i Nana** za koje se tvrdi da im je mijenjan gen za receptor CCR5 iako nije bilo medicinski opravdano - dokazi nisu pokazani! (znanstvenik He Jiankui). Treća beba je bila navodno na putu
- Prijedlog od navedenih znanstvenika za **moratorij na kliničku upotrebu** uređivanja DNA ljudskih spolnih stanica (jajne stanice i spermiji) u svrhu stvaranja genetički modificirane djece. Ovo se **ne odnosi** na uređivanje genoma u istraživačke svrhe koje neće rezultirati trudnoćom ili somatskih stanica

## Adopt a moratorium on heritable genome editing

Eric Lander, Françoise Baylis, Feng Zhang, Emmanuelle Charpentier, Paul Berg and specialists from seven countries call for an international governance framework.



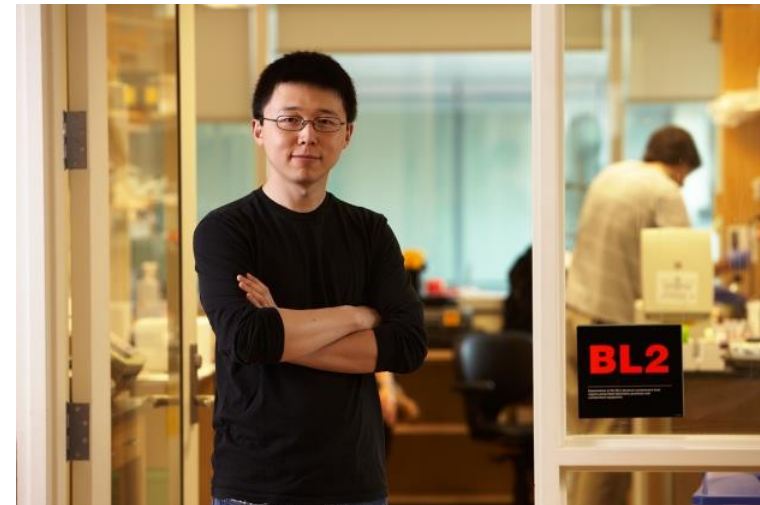
Embryos cultured as part of *in vitro* fertilization can be screened for genetic diseases.



# Zanimljivosti - patent

- Svađa između dvije istraživačke grupe oko „Gene-editing“ patenta („uređivanje gena“)
- Jedna grupa je pod voditeljstvom dr. Jennifer Doudna, University of California, Berkeley, i dr. Emmanuelle Charpentier, Max Planck Institute for Infection Biology in Berlin.
- Druga grupa je pod voditeljstvom Feng Zhang, Broad Institute MIT i Harvard, Cambridge, Massachusetts
- Prva prijava je poslana u svibnju 2012. od grupe iz Kalifornije, a druga iz Broad-a u prosincu 2012. za **uređivanje ljudskih stanica** i platili su da ide po bržoj proceduri
- Prvi patent je dodijeljen u travnju 2014. grupi iz Broad-a
- Patent „interference“ je proglašen u siječnju 2016!

<https://thenib.com/bad-blood>

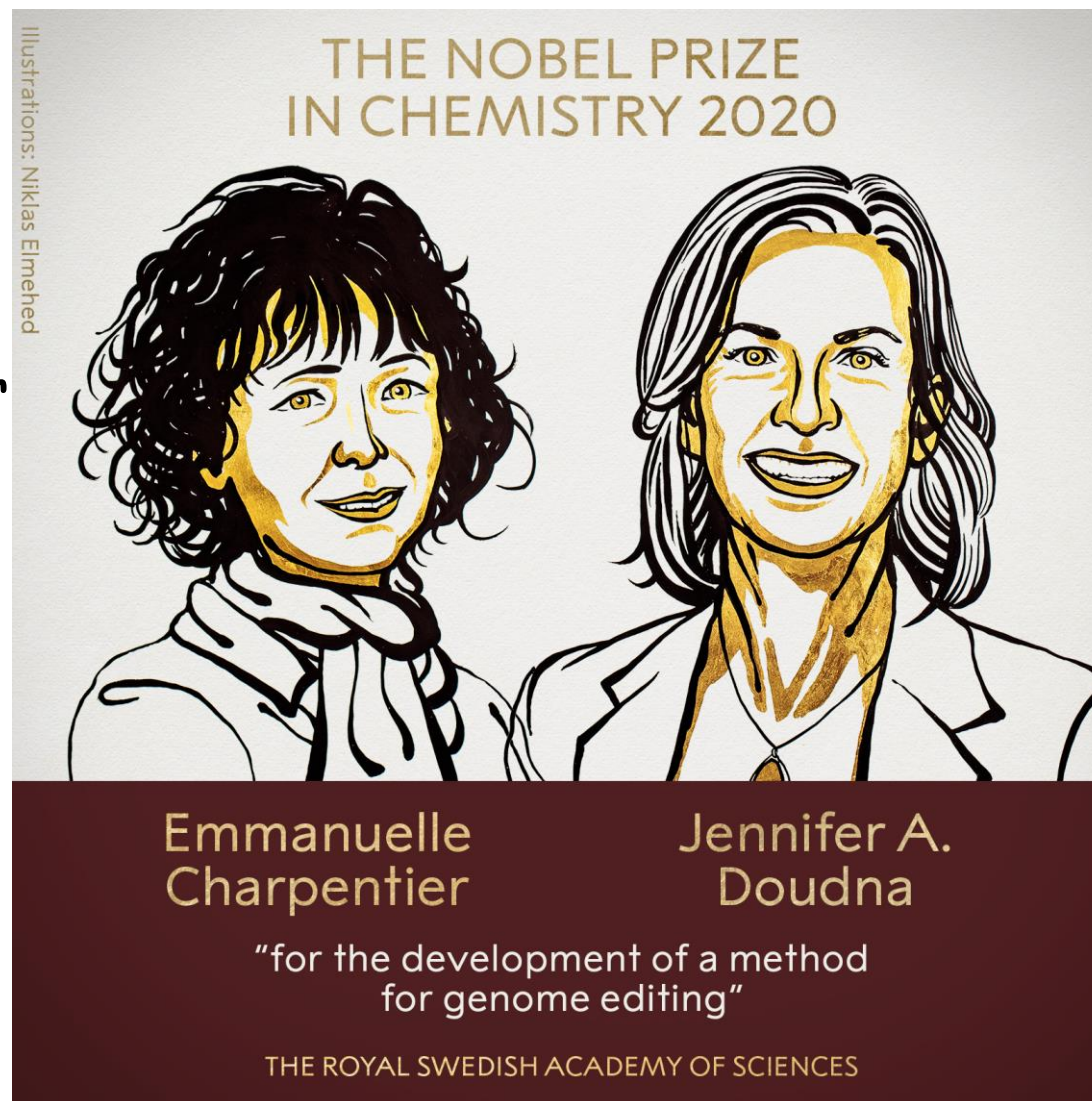


# Zanimljivosti - patent

- Prvi patent je dobila grupa s MIT-a jer su iz US Patent and Trademark Office (USPTO) smatrali da su oni **prvi stvorili novu tehnologiju** a nije važan datum prijave (2013 je to promijenjeno)
- Trenutno je prijavljeno preko 11000 patenata povezanih s tehnologijom CRISPR-Cas
- Nekoliko saslušanja i patent za primjenu metode u eukariotskim stanicama više puta je dobio **Feng Zhang**, ali se grupa iz Kalifornije opet namjerava žaliti na presudu. Zadnje je 28.2.2022. USPTO odlučio da je Broad prvi za nekoliko tjedana!
- CVC tim (J. Doudna i E. Charpentier) će se vjerojatno žaliti do američkog vrhovnog suda
- Na europskom sudu isto nije sve sasvim glatko i patent je odbijen jer nisu predani svi papiri...
- U međuvremenu su otkriveni drugi enzimi, Cas12 i Cas13 ili Cas14 koji su manji i lakše se mogu unijeti u stanice i razvijeni su mnogi drugi alati pa se može izbjeći upotreba Cas9

# Nobelova nagrada za kemiju 2020.

Od 1901. do danas  
samo je 7 žena zajedno  
s Emmanuelle i Jennifer  
primilo Nobelovu  
nagradu za kemiju!



Također su dobile Breakthrough Prize 2015 od tehnološke industrije i mnoge druge

# Pitanja

1. Koju će od navedenih sekvenci DNA prepoznati restrikcijski enzim?

- A. TGCCGT
- **B. TGCGCA**
- C. TGCTGC
- D. sve navedene
- E. niti jedna

2. Želite klonirati gen iz krumpira. Koji enzim biste uzeli, EcoRI ili **BamHI**?

3. Koja je izjava o sustavu CRISPR-Cas9 netočna?

- a)** CRISPR-Cas9 izvodi uređivanje DNA u ljudskim stanicama
- b) Tehnologija CRISPR-Cas9 temelji se na proteinu i vodećoj RNA
- c) CRISPR-Cas9 izvodi istu reakciju bakterijskoj i ljudskoj stanici
- d) Za tehnologiju CRISPR-Cas9 nije potrebna skupa oprema

