

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Εφαρμογή της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 στην έρευνα για τον σακχαρώδη διαβήτη και την παχυσαρκία

Το σύστημα συσσωρευμένων, τακτικά παρεμβαλλόμενων, βραχέων παλινδρομικών επαναλήψεων (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) και της πρωτεΐνης 9 που σχετίζεται με το CRISPR (associated protein-9, CRISPR-Cas9) ήταν μια από τις μεγαλύτερες επιστημονικές ανακαλύψεις της τελευταίας δεκαετίας. Η εξαιρετικά αποτελεσματική και ακριβής ικανότητα επεξεργασίας του γονιδιώματος με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 έχει μεγάλη θεραπευτική αξία και οφέλη, παρέχοντας στις βασικές επιστήμες ένα επί πλέον ερευνητικό εργαλείο. Η τεχνολογία του CRISPR έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως στη βιολογία του καρκίνου, στην ιολογία και στη βασική κυτταρική βιολογία. Όμως, στην έρευνα για τον σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ) και την παχυσαρκία υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα. Ένας πιθανός λόγος γι' αυτό είναι ότι η έρευνα για τον ΣΔ είναι πλέον πολύπλοκη, επειδή περιλαμβάνει συνδυασμό μεταξύ πολλαπλών οργάνων και κυτταρικών τύπων. Ωστόσο, πολλά αναπάντητα ερωτήματα μπορούν ακόμη να απαντηθούν με τη χρήση της μεθόδου της γενετικής παρέμβασης CRISPR/Cas9. Σε αυτή την ανασκόπηση συνοψίζονται τα ερευνητικά δεδομένα και τα αποτελέσματα που υπάρχουν με τη χρήση του CRISPR/Cas9 και δίνεται μια προοπτική για τον τρόπο με τον οποίο αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω στην έρευνα για τον ΣΔ και την παχυσαρκία.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο στόχος της μελέτης της γενετικής είναι η διευκρίνιση της λειτουργίας των γονιδίων σε ορισμένες βιολογικές διεργασίες και ασθένειες.¹ Η αντίστροφη γενετική προσέγγιση βασίζεται σε υποθέσεις και γνώσεις με βάση «ενοχλητικά» γονίδια ενδιαφέροντος, όπου χαρακτηρίζεται ο επακόλουθος βιολογικός φαινότυπος και, ως εκ τούτου, η προσέγγιση είναι «γονότυπος-φαινότυπος».¹ Η αντίστροφη γενετική επιδιώκει να εντοπίσει ποιοι φαινότυποι ελέγχονται από συγκεκριμένες γονιδιακές αλληλουχίες.² Αντίθετα, η πρόσθια γενετική (forward genetics) είναι η προσέγγιση «φαινότυπου προς γονότυπο», η οποία αρχίζει με έναν φαινότυπο ενδιαφέροντος και, μέσω της υψηλής απόδοσης γενετικού ελέγχου, προσδιορίζει ορισμένες γονιδιακές διαταραχές. Ουσιαστικά, η πρόσθια γενετική είναι η αποσαφήνιση της γενετικής βάσης ενός συγκεκριμένου φαινότυπου με τον έλεγχο ενός πληθυσμού που περιέχει τυχαίες γονιδιωματικές τροποποιήσεις, οι οποίες αλλάζουν τη γονιδιακή

λειτουργία. Η πρόσθια γενετική τεχνολογία μεταφέρεται συνήθως σε μοντέλα συστημάτων, περιλαμβανομένων των ζυμομυκήτων, των νηματωδών, των μυγών, και των zebrafish, στα οποία έχουν βρεθεί πολλοί μηχανισμοί και μονοπάτια στη σηματοδότηση και στην ανάπτυξη του οργανισμού. Μέχρι πρότινος, ήταν τεχνικά δύσκολο να μεταφερθεί η πρόσθια γενετική σε συστήματα θηλαστικών, επειδή η αλλαγή του φαινότυπου συχνά απαιτούσε πλήρη απώλεια της λειτουργίας τους, που ήταν χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία και επειδή ήταν και δύσκολο να γίνει σε μεγάλη κλίμακα.² Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία, στη γενετική έχει γίνει μια τεράστια ευεργετική αλλαγή με τη χρήση παρεμβολής RNA (RNA interference, RNAi) και το σύστημα συσσωρευμένων, τακτικά παρεμβαλλόμενων, βραχέων παλινδρομικών επαναλήψεων (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) και της πρωτεΐνης 9 που σχετίζεται με το CRISPR (associated protein-9, CRISPR/Cas9). Το σύστημα CRISPR, συγκεκριμένα, σε συνδυασμό με την αλληλούχιση επόμενης γενιάς

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2025, 42(3):330-340
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2025, 42(3):330-340

Ι.Α. Αναστασίου,
Ε. Ρέμπελου,
Α. Τεντολούρη,
Ε. Αποστολοπούλου,
Ν. Τεντολούρης

1η Προπαιδευτική Παθολογική
Κλινική και Ειδική Νοσολογία, Γενικό
Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», Ιατρική
Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Application of CRISPR/Cas9
technology on research in diabetes
mellitus and obesity

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

β-κύτταρα
Cas9
CRISPR-Cas
Παχυσαρκία
Σακχαρώδης διαβήτης

Υποβλήθηκε 20.3.2024
Εγκρίθηκε 30.3.2024

(next-generation sequencing, NGS), κατέστησαν εφικτό τον αποτελεσματικό γενετικό έλεγχο στη μελέτη των θηλαστικών.³ Από την εισαγωγή της τεχνολογίας αυτής έχουν εκπονηθεί πολλές μελέτες που οδήγησαν σε ανακαλύψεις σε διάφορα ερευνητικά πεδία, ιδιαίτερα στη βιολογία του καρκίνου, στην ιολογία, στην ανοσολογία και στη βασική κυτταρική βιολογία.³ Ωστόσο, δεν έχει υιοθετηθεί ευρέως στον τομέα της έρευνας για τον σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ), επειδή η έρευνα για τον ΣΔ συχνά περιλαμβάνει διασταυρούμενη αλληλεπίδραση μεταξύ πολλών οργάνων, ιστών ή κυτταρικών τύπων, η οποία καθιστά δυσχερή τη χρήση της τεχνολογίας του CRISPR.⁴ Παρ' όλα αυτά, είναι σημαντικό να αρχίσουμε να απαντάμε τα αναπάντητα ερωτήματα που υπάρχουν στην παθοφυσιολογία του ΣΔ και της παχυσαρκίας. Το σύστημα CRISPR μπορεί να παρέχει αρχικές ενδείξεις για τους μηχανισμούς της παθοφυσιολογίας του ΣΔ και της παχυσαρκίας, οι οποίοι στη συνέχεια μπορούν να μελετηθούν περαιτέρω σε συστηματικό επίπεδο. Στο άρθρο αυτό παρέχεται μια ανασκόπηση της μεθοδολογίας στην τεχνολογία του συστήματος CRISPR, συνοψίζοντας το πώς η εν λόγω τεχνολογία έφερε επανάσταση στην έρευνα σε πολλούς τομείς και παρέχοντας μια προοπτική για το πώς μπορεί να πραγματοποιηθεί περαιτέρω έρευνα για τον ΣΔ και την παχυσαρκία.

2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το σύστημα αυτό αποτελείται από δύο τμήματα: το CRISPR, το οποίο αφορά σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται διάσπαρτες στο γενετικό υλικό, και στις πρωτεΐνες Cas, οι οποίες συνιστούν μια κατηγορία ενζύμων (νουκλεάσες) που κόβουν τα νουκλεϊκά οξέα (DNA ή RNA).⁵ Η τεχνολογία του CRISPR/Cas παρουσιάζει πολύ μεγάλη εξειδίκευση ως προς τον DNA-στόχο και θεωρείται πολύ απλή και αξιόπιστη. Το σύστημα CRISPR/Cas ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από Ιάπωνες επιστήμονες στο βακτήριο *Escherichia coli*.⁶ Πρόκειται για έναν μηχανισμό άμυνας των βακτηρίων για την προστασία τους από τις ιικές μολύνσεις. Όταν ένας ιός επιτίθεται σε ένα βακτήριο, το σύστημα CRISPR των βακτηρίων ενσωματώνει μέρος του γενετικού υλικού του ιού στο δικό του DNA.^{6,7} Αρχικά, το ιικό DNA χωρίζεται σε θραύσματα και ενσωματώνεται στην αλληλουχία CRISPR των βακτηρίων. Στη συνέχεια μεταγράφεται η αλληλουχία, δηλαδή το DNA μετατρέπεται σε RNA, το οποίο επίσης διασπάται σε μικρά θραύσματα, τα CRISPR RNAs. Αυτά τα κομμάτια προσδένονται στις πρωτεΐνες Cas, οι οποίες δρουν ως μοριακά ψαλίδια. Τα συγκεκριμένα σύμπλοκα δρουν ως ανιχνευτές και όταν ο ίδιος ιός εισβάλλει ξανά στα βακτήρια, τον θανατώνουν αμέσως και κόβουν το γενετικό του υλικό. Έτσι, ο ιός εισβο-

λέας δεν είναι σε θέση να πολλαπλασιαστεί σε βακτηριακά κύτταρα, ενώ τα κύτταρα αποκτούν ανοσία σε μελλοντικές λοιμώξεις. Η πρώτη σημαντική ανακάλυψη στο σύστημα CRISPR/Cas πραγματοποιήθηκε από επιστήμονες που δεν είχαν κατά νου την πιθανή σχέση της εν λόγω τροποποίησης με την τροποποίηση του γονιδιώματος και τη μελέτη των ανθρώπινων γενετικών ασθενειών. Οι επιστήμονες ήθελαν να μελετήσουν τον μικρόκοσμο των μικροβίων και τις δυνατότητες για βιομηχανικές εφαρμογές, όπως η επίθεση βακτηρίων και η αντιμετώπιση ιών που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή τροφίμων. Φυσικά, η ιδέα ότι θα μπορούσε να μετατραπεί το σύστημα CRISPR/Cas σε ένα ισχυρό εργαλείο αλλαγής γονιδιώματος σύντομα έγινε πραγματικότητα.^{6,7} Από το 2011–2012 αποδείχθηκε πειραματικά ότι το συγκεκριμένο σύστημα λειτουργεί αυτόνομα στοχεύοντας σε αυθαίρετες ακολουθίες.^{8,9} Αργότερα, οι ερευνητές απέδειξαν ότι η τροποποίηση των κυττάρων των θηλαστικών με το σύστημα CRISPR/Cas μπορεί να πραγματοποιηθεί σχετικά εύκολα, αναδεικνύοντας τις δυνατότητες για απεριόριστες εφαρμογές, ανάλογες της ανθρώπινης εφευρετικότητας.¹⁰ Τώρα που έχει γίνει γνωστή η ακριβής δομή και λειτουργία του συμπλέγματος CRISPR/Cas, θα επιτραπεί στο γονιδίωμα να κοπεί σε ένα συγκεκριμένο επιθυμητό σημείο με πολύ υψηλή ακρίβεια και μικρό κόστος.¹¹ Ενώ η δημιουργία μεταλλάξεων σε ανεπιθύμητες θέσεις είναι περιορισμένη, η εργαστηριακή διαδικασία είναι πολύ απλούστερη από τις προηγούμενες τεχνολογίες και θεωρείται πλέον ένα ισχυρό και ταυτόχρονα απλό σύστημα τροποποίησης γονιδιώματος με πολλές εφαρμογές σε πολλούς διαφορετικούς τομείς.¹²

3. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CRISPR/CAS9, ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Το σύστημα CRISPR/Cas9 έγινε γρήγορα ένα εύχρηστο και αποτελεσματικό εργαλείο σε πολλούς τομείς της βιολογικής έρευνας. Οι ερευνητές Emmanuelle Charpentier και Jennifer Doudna που ανακάλυψαν την τεχνολογία του CRISPR έλαβαν το 2020 Βραβείο Νόμπελ Χημείας.¹³ Η τεχνολογία CRISPR/Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην επεξεργασία των γονιδίων μέσω επαγωγής μεταλλάξεων και ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας την έκφρασή τους.¹⁴

Η δραστηριότητα του CRISPR απαιτεί έναν τόπο CRISPR που περιέχει μια ακολουθία αλληλουχιών επαναλαμβανόμενης διαίρεσης και έναν αριθμό γονιδίων Cas. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για δράσεις, όπως επεξεργασία, λειτουργικότητα και αποκοπή.¹⁵ Ολόκληρος ο μηχανισμός άμυνας μπορεί να συνοψιστεί σε τρία βήματα: (α) την ενσωμάτωση, (β) την έκφραση και την ωρίμανση, και (γ) την παρεμβολή.

3.1. Η ενσωμάτωση των διαχωριστικών αλληλουχιών CRISPR/Cas

Η φάση απόκτησης του τύπου CRISPR δομεί τη γενετική μνήμη του κυττάρου.^{15,16} Σε αυτό το στάδιο, μια νέα διαχωριστική αλληλουχία που αποκτάται με διείσδυση μετά την αρχική επαφή με το πλασμίδιο ή το ξένο DNA ενσωματώνεται στη συστοιχία CRISPR. Με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα είναι σε θέση να προσαρμοστούν σε εισβολείς στο περιβάλλον. Το εν λόγω στάδιο ονομάζεται επίσης «προσαρμογή».^{15,16} Η ενσωμάτωση των διαχωριστικών αλληλουχιών γίνεται σε δύο βήματα.¹⁷⁻¹⁹ Στο πρώτο βήμα, η πρωτεΐνη Cas του βακτηρίου αναγνωρίζει τον εισβολέα και αποκτά μια ειδική αλληλουχία από το ξένο νουκλεϊκό οξύ. Οι αλληλουχίες αυτές ονομάζονται πρωτο-διαχωριστικές. Ως δεύτερο βήμα, η πρώτη ακολουθία διαχωρισμού ενσωματώνεται στο τέλος της ακολουθίας οδηγού στη συστοιχία CRISPR ως ακολουθία διαχωρισμού ("spacer"). Έτσι, η πρώτη επαναλαμβανόμενη μονάδα της συστοιχίας CRISPR επεκτείνεται.¹⁷⁻¹⁹ Οι διαχωριστικές αυτές αλληλουχίες ή αλλιώς "spacers" είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία της ανοσιακής μνήμης στα αρχαία και στα βακτήρια, ώστε να αμυνθούν σε περίπτωση που έλθουν σε επαφή εκ νέου με τα κινητά γενετικά στοιχεία (mobile genetic elements, MGEs).¹⁷⁻¹⁹ 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 την εν λόγω διαδικασία.^{15,16} Οι πρωτεΐνες Cas1 και Cas2 είναι οι πλέον σημαντικές στη φάση απόκτησης των διαχωριστικών αλληλουχιών του CRISPR. Αυτές λειτουργούν ως σύμπλοκο, όπου ένα διμερές της Cas2 προσδένεται σε δύο διμερή της Cas1 προκειμένου να εκτελέσει τη λειτουργία του. Η παρουσία του παρακείμενου μοτίβου PAM (πρωτο-διαχωριστική αλληλουχία, protospacer adjacent motif, PAM) είναι προαπαιτούμενη για τη διάκριση μεταξύ του στόχου και της συστοιχίας CRISPR και αξιοποιείται κατά το πρώτο αυτό στάδιο. Όπως έχει αποδειχθεί, οι νέες διαχωριστικές αλληλουχίες εισάγονται στο άκρο του οδηγού της συστοιχίας CRISPR. Η παλίνδρομη αλληλουχία των 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.^{15,16}

3.2. Η έκφραση και η ωρίμανση του συστήματος CRISPR/Cas

Μετά την επιτυχή προσαρμογή των νέων διαχωριστικών αλληλουχιών ακολουθεί η έκφραση των CRISPR RNA (crRNA) και των πρωτεϊνών Cas.^{17,20,21} Η αλληλουχία-οδηγός

λειτουργεί ως εκκινητής και αρχίζει 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 μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία στο 3' άκρο. Το νεοσυντιθέμενο ώριμο crRNA αλληλοεπιδρά με το μικρό tracrRNA και μαζί καθοδηγούν τη θραύση του DNA-στόχου, όπως αυτή επάγεται από την Cas9.^{17,20,21}

3.3. Η παρεμβολή του συστήματος CRISPR/Cas

Στο στάδιο αυτό της παρεμβολής δημιουργείται το σύμπλοκο Cas-crRNA μετά την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Cas με το crRNA.¹⁷ Το εν λόγω σύμπλοκο ανιχνεύει ξένα κινητά γενετικά στοιχεία μέσω συμπληρωματικότητας αλληλουχίας σε crRNA, ενώ τα στοχευόμενα στοιχεία αποκόπτονται στη συνέχεια. Η παρουσία μιας διατηρημένης αλληλουχίας μικρού μήκους (2-5 ζεύγη βάσεων), γνωστή ως PAM είναι απαραίτητη για την ταυτοποίηση των νουκλεϊνικών οξέων από το σύμπλοκο Cas-crRNA. Το PAM βρίσκεται δίπλα στην περιοχή-στόχο σε σχέση με τον εισβολέα νουκλεϊκό οξύ.¹⁷

4. ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΜΙΑΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ CRISPR

Πριν από τον σχεδιασμό και την εκτέλεση ενός πειράματος με τη χρήση της τεχνολογίας του CRISPR/Cas9, υπάρχουν μερικά σημαντικά στοιχεία που πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν, περιλαμβανομένου του τύπου των κυττάρων, του μεγέθους και του τύπου της βιβλιοθήκης CRISPR, καθώς και της διαδικασίας διαχωρισμού των κυττάρων.²² Στην ιδανική περίπτωση, ένας μόνο κυτταρικός τύπος θα πρέπει να χρησιμοποιείται, καθώς η χρήση ενός μείγματος που περιέχει πολλαπλούς τύπους κυττάρων θα δημιουργήσει πολυπλοκότητα στο στάδιο διαχωρισμού και επιλογής των κυττάρων.²² Για την ανάλυση CRISPR απαιτείται μεγάλος αριθμός κυττάρων, καθώς είναι απαραίτητος για την επαρκή κάλυψη του οδηγού RNA (guide-RNA, gRNA) στη βιβλιοθήκη, και αυτό επιτυγχάνεται μέσω κορεσμού του αριθμού των κυττάρων. Οι βιβλιοθήκες CRISPR σε όλο το γονιδίωμα περιέχουν ένα εύρος από 60.000-200.000 gRNA και συνίστανται τουλάχιστον από 500 κύτταρα ανά gRNA σε όλη τη διαδικασία, καθώς και από 2-4 επαναλήψεις ανά δείγμα.²³

Ως εκ τούτου, συνήθως εκατοντάδες εκατομμύρια κύτταρα απαιτούνται για την εκκίνηση της ανάλυσης CRISPR.²²

Ένας ερευνητής που χρησιμοποιεί την τεχνολογία CRISPR πρέπει επίσης να αποφασίσει ποιο είδος gRNA είναι το καταλληλότερο για τη μελέτη του.²³ Οι πλέον γνωστές βιβλιοθήκες για ολόκληρο το γονιδίωμα knockout CRISPR περιλαμβάνουν CRISPR/Cas9 σε επίπεδο γονιδιώματος knockout (GeCKO) (άνθρωπος και ποντίκι),²⁴ Brie (ποντίκι) και Brunello (άνθρωπος).²⁵ Μπορεί να χρησιμοποιηθούν βιβλιοθήκες μικρότερης κλίμακας που περιέχουν μια συγκεκριμένη κατηγορία γονιδίων για περισσότερο εστιασμένη ανάλυση με σχετικά χαμηλό αριθμό κυττάρων.^{23,26} Επί πλέον, υπάρχουν προκατασκευασμένες βιβλιοθήκες CRISPR και γίνεται προσαρμογή στη σύνθεση βιβλιοθηκών.^{23,26} Η πλειοψηφία των βιβλιοθηκών CRISPR στοχεύει κύτταρα ανθρώπινα ή από ποντίκι, οπότε εάν ο ερευνητής επιθυμεί να αναλύσει ένα διαφορετικό ζωικό μοντέλο, πρέπει να δημιουργήσει μια προσαρμοσμένη βιβλιοθήκη CRISPR ή να γίνει παραγωγή mRNA, χρησιμοποιώντας κύτταρα από το επιλεγμένο είδος.²⁷

Οποιαδήποτε ανάλυση CRISPR απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό και μέθοδο διαχωρισμού των κυττάρων, η οποία μπορεί να ποικίλλει ευρέως σε όρους φαινότυπου, μεθόδου επιλογής και πολυπλοκότητας.²² Οι συνθέστερες αναλύσεις αφορούν στη βιωσιμότητα και τη φυσική κατάσταση των κυττάρων, με την ανίχνευση gRNA όπου είτε είναι μεγάλος ο αριθμός των gRNA είτε έχουν εξαντληθεί σε έναν πληθυσμό μετά τη θεραπεία.²⁸ Τα πολλά gRNA επάγουν μια μετάλλαξη που είναι ευεργετική για την επιβίωση ή τον πολλαπλασιασμό στη δεδομένη κατάσταση, ενώ τα gRNA τα οποία έχουν εξαντληθεί υποδεικνύουν μεταλλάξεις αρνητικές για την υγεία ή την ανάπτυξη των κυττάρων. Η ανίχνευση των εξαντλημένων gRNAs, που αναφέρονται επίσης ως αρνητική επιλογή ή έλεγχος εγκατάλειψης, απαιτεί μεγαλύτερη κάλυψη και ενδέχεται να είναι περισσότερο απαιτητική.²⁸ Εκτός από τη βιωσιμότητα και την καταλληλότητα, οποιοδήποτε μετρήσιμο χαρακτηριστικό μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως επιλογή για μια ανάλυση CRISPR.^{29,30} Αυτό γίνεται συχνά μέσω κυτταρομετρίας ροής (fluorescence-activated cell sorting, FACS), όπου ο φθορίζων βιοδείκτης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό κυττάρων και το gRNA σε αφθονία συγκρίνεται μεταξύ των ταξινομημένων ομάδων. Οι επιλογές διαλογής με τη χρήση του FACS περιορίζονται στους διαθέσιμους δείκτες, όπως αντισώματα ή κύτταρα αναφοράς, που είναι διαθέσιμα.^{29,30} Ωστόσο, νέες και περισσότερο περίπλοκες στρατηγικές επιλογής με τη χρήση του FACS αναπτύσσονται συνεχώς.^{31,32} (εικ. 1).

5. ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ CRISPR/CAS9 ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

Η γονιδιακή θεραπεία προσφέρει τη δυνατότητα θερα-

πείας περισσότερων από 10.000 μονογενετικών παθήσεων και θα μπορούσε να συνδράμει στη θεραπεία τόσο των μονογενετικών όσο και των σύνθετων πολυπαραγοντικών νόσων.³³ Η χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 είναι ένα καινοτόμο εργαλείο γονιδιακής θεραπείας που προσφέρει πολλές δυνατότητες.^{34,35} Ωστόσο, καθώς το πεδίο της έρευνας και των κλινικών δοκιμών της συγκεκριμένης τεχνολογίας συνεχώς επεκτείνεται, οι τεχνικές δυσκολίες και τα ζητήματα ασφάλειας πρέπει να επιλυθούν πριν καταστεί συνήθης πρακτική η κλινική εφαρμογή.^{34,35}

Παρακάτω παρατίθεται μια σύντομη ανασκόπηση των εφαρμογών της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 που σχετίζονται με την Ιατρική, τόσο σε ερευνητικό, προκλινικό όσο και σε κλινικό επίπεδο.

5.1. Πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου

Οι πολυμορφισμοί μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (single nucleotide polymorphisms, SNPs) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί δείκτες, επειδή σχετίζονται με γονίδια υπεύθυνα για μια ποικιλία σύνθετων ασθενειών, όπως οι καρδιακές παθήσεις, ο ΣΔ, ο καρκίνος, η σχιζοφρένεια, η αρτηριακή υπέρταση, η ημικρανία και η νόσος Alzheimer.³⁶ Αυτά τα SNPs εντοπίζονται κατά βάση μέσα σε ένα γονίδιο ή σε μια ρυθμιστική περιοχή κοντά σε ένα γονίδιο και πιθανόν να επηρεάσουν τη λειτουργία του γονιδίου και κατά συνέπεια την εξέλιξη της νόσου. Ως εκ τούτου, τα SNPs παρέχουν τη δυνατότητα ανάπτυξης φαρμακευτικών πρωτοκόλλων αξιολογώντας τη γενετική σύνθεση ενός ατόμου.³⁶ Πρόσφατα, σε μια μελέτη οι ερευνητές χρησιμοποίησαν το CRISPR/Cas9 για να δημιουργήσουν ποντίκια που φέρουν τον ανθρώπινο ειδικό πολυμορφισμό (SNP-rs1039084) στον γενετικό τόπο STXBP5, που έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο θρομβώσεων.³⁷ Κατά συνέπεια, τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα του παράγοντα von Willebrand, μειωμένη παραγωγή αιμοπεταλίων και μειωμένη πιθανότητα θρομβώσεων, αλλά αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας, σε σύγκριση με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου. Η μελέτη αυτή έδωσε μια λειτουργική σύνδεση μεταξύ της θρόμβωσης και του SNP-rs1039084.³⁷

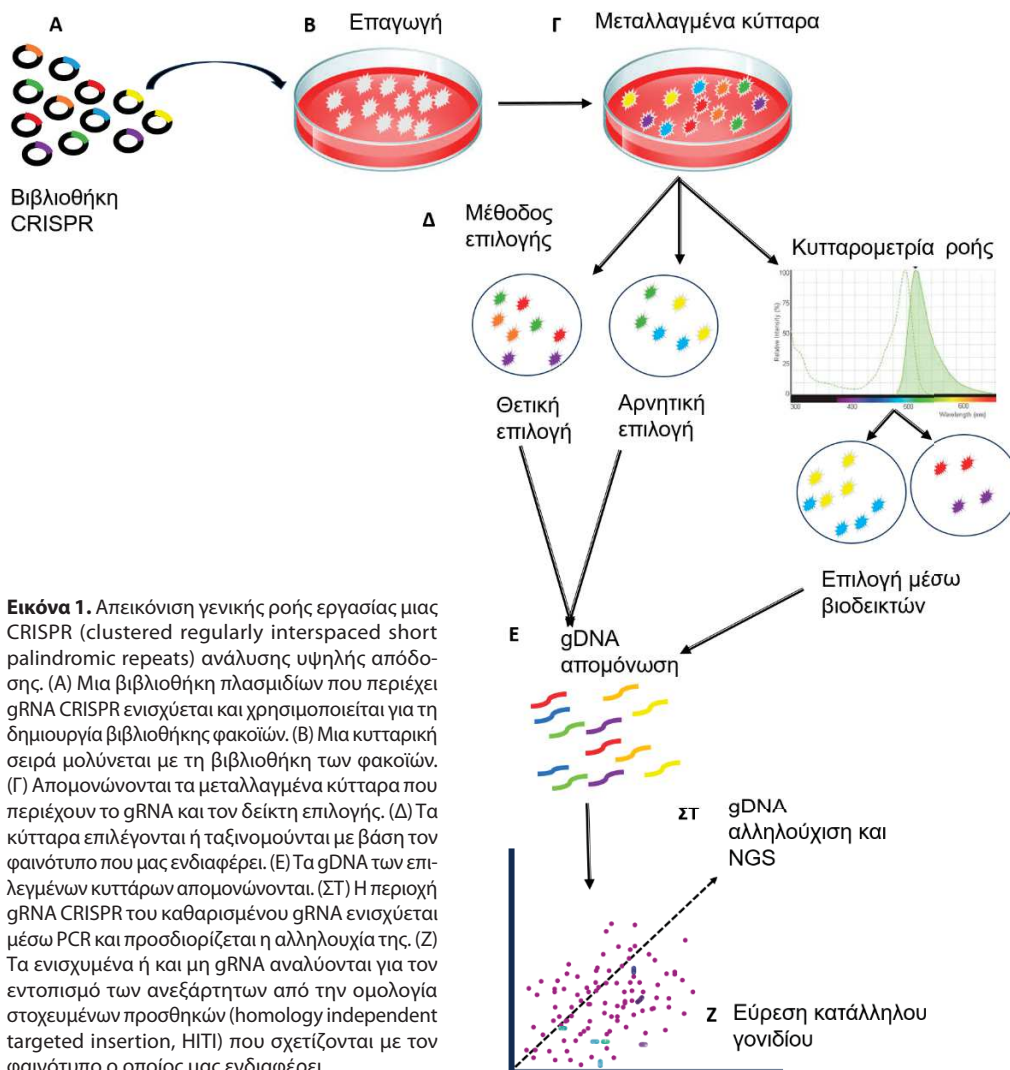
Μετά την αναγνώριση ενός SNP (rs78744187) που σχετίζεται με μειωμένη ποσότητα βασεόφιλων στο αίμα, μια ομάδα ερευνητών χρησιμοποίησαν την CRISPR/Cas9 γονιδιακή επεξεργασία για να εισάγουν το εν λόγω SNP σε ανθρώπινα αιμοποιητικά βλαστικά και πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα.³⁸ Η διαφοροποίηση των τροποποιημένων βλαστικών κυττάρων προς βασεόφιλα ήταν αισθητά μειωμένη σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.³⁸ Σε μια άλλη μελέτη οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ένα SNP στο γονίδιο *KRT12*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την επιθηλιακή δυστροφία του

κερατοειδούς (Meesmann's epithelial corneal dystrophy), δημιουργεί ένα νέο μοτίβο PAM.³⁹ Χρησιμοποιώντας το CRISPR/Cas9 για να στοχεύσουν το SNP, ήταν σε θέση να μειώσουν την έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *KRT12* χωρίς να επηρεάσουν το φυσιολογικό γονίδιο σε αθανάτοποιημένα ανθρώπινα κύτταρα κερατοειδούς. Επί πλέον, ανέδειξαν αποτελεσματική γενετική στόχευση CRISPR/Cas9 του *KRT12* σε ποντίκια που φέρουν το ανθρώπινο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο.³⁹

5.2. Πολλαπλές μεταλλάξεις

Οι κακοήθειες συνήθως προκύπτουν μετά από μεταλλαξιγένεση πολλαπλών γονιδίων, καθιστώντας συχνά τα ποντίκια που φέρουν μια γονιδιακή μετάλλαξη ακατάλληλα μοντέλα για τη μελέτη του καρκίνου.⁴⁰ Το σύστημα CRISPR/Cas9, το οποίο μπορεί να στοχεύσει πολλαπλούς τόπους

ταυτόχρονα, παρέχει καινοτόμες στρατηγικές για τη μελέτη του καρκίνου και άλλων πολυπαραγοντικών ασθενειών. Οι επιστήμονες δημιούργησαν ένα *in vivo* μοντέλο οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CRISPR/Cas9 για την ταυτόχρονη τροποποίηση έως και 5 γονιδίων σε αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα ποντικού. Αυτό επιτεύχθηκε με την παροχή διαφορετικών συνδυασμών Cas9 ενδονουκλεασών και μικρών gRNAs, η οποία οδήγησε στην παραγωγή μυελοειδών κακοήθων όγκων.⁴⁰ Μια άλλη ομάδα ερευνητών αδρανοποίησε τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *Pten* και *p53* στο ήπαρ των ποντικών, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό.⁴¹ Η CRISPR/Cas9 στόχευση των γονιδίων *Pten* και *p53* προκάλεσε ηπατικούς όγκους με χαρακτηριστικά διαφοροποίησης χοληφόρου πόρου, αποδεικνύοντας ότι είναι εφικτή η ταυτόχρονη δημιουργία μεταλλάξεων διαφορετικών γονιδίων και στα δύο αλληλόμορφα.⁴¹



5.3. Σπάνιες ασθένειες

Η χρήση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 έχει συνδράμει σημαντικά στη μελέτη σπάνιων ασθενειών.⁴² Μια μελέτη σχετικά με μια σπάνια κληρονομική μυοπάθεια με ανεπάρκεια πεπτιδάσης (kyphoscoliosis peptidase, KY) παρουσιάζει την ανάπτυξη ενός νέου μοντέλου CRISPR/Cas9 σε zebrafish για τη μελέτη της νόσου.⁴³ Μελέτη αυτών των zebrafish οδήγησε στην αναγνώριση μιας νέας μοριακής «υπογραφής» που χαρακτηρίζει την έλλειψη KY.⁴³ Πρόσφατα, σε μια μελέτη που διενεργήθηκε σε χοίρους, έγινε προσπάθεια μοντελοποίησης της χορείας του Huntington (HD) μέσω της επεξεργασίας γονιδίων CRISPR/Cas9. Αυτοί οι χοίροι εκφράζουν ενδογενώς την αντίστοιχη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη πλήρους μήκους (huntingtin) και πάσχουν από τυπική HD.⁴⁴

5.4. Η τεχνολογία του συστήματος CRISPR/Cas9

στις ερευνητικές προσεγγίσεις για τον σακχαρώδη διαβήτη

Αν και η τεχνολογία CRISPR-Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πολλά ερευνητικά πεδία, υπάρχουν λίγες μόνο μελέτες όπου οι ερευνητές έχουν εφαρμόσει την τεχνολογία CRISPR στην έρευνα για τον ΣΔ.⁴

Η τεχνολογία CRISPR-Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί στην έρευνα για τον ΣΔ σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε κυτταρικές σειρές και σε πειραματόζωα. Σε μια μελέτη οι ερευνητές ανέπτυξαν ένα σύστημα knock-out CRISPR/Cas9 για τη μελέτη συγκεκριμένων γονιδίων σε μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά παγκρεατικών β-κυττάρων.⁴⁵ Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την ανθρώπινη κυτταρική σειρά EndoC-βH1. Το knock-out πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διπλού φακοϊού sgRNA και οι ερευνητές στόχευσαν τρία βασικά γονίδια με γνωστή λειτουργία στα παγκρεατικά β-κύτταρα: το γονίδιο της ινσουλίνης (insulin, *INS*), το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο αποικοδόμησης της ινσουλίνης (insulin degrading enzyme, *IDE*) και το γονίδιο της πεπτιδυλογλυκίνης α-αμιδιωτικής μονοοξυγενάσης (peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase, *PAM*). Στα αποτελέσματά τους φάνηκε σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA και της λειτουργίας όλων των πρωτεϊνών των γονιδίων-στόχων. Συνολικά, η συγκεκριμένη στρατηγική για την αποτελεσματική δημιουργία knock-out στην ανθρώπινη β-κυτταρική σειρά EndoC-βH1 θα επιτρέψει την καλύτερη κατανόηση των γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική δυσλειτουργία των β-κυττάρων, την εύρεση των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών και την καλύτερη αποσαφήνιση της παθογένειας του ΣΔ τύπου 2 (ΣΔ2).⁴⁵

Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι το *IRX3* και το

IRX5 είναι δύο μακρινά γονίδια προγονικών λιποκυττάρων, που λειτουργούν κυρίως ως ελεγκτές μιας διαδικασίας γνωστής ως θερμογένεση, σύμφωνα με την οποία τα λιποκύτταρα διαχέουν την ενέργεια ως θερμότητα, αντί να την αποθηκεύουν σε μορφή λίπους, χάρη στη δράση της uncoupling protein 1 (UCP-1).⁴⁶ Η θερμογένεση μπορεί να προκληθεί από την άσκηση, τη δίαιτα ή την έκθεση στο κρύο και συμβαίνει τόσο στα καφέ λιποκύτταρα, που είναι πλούσια σε μιτοχόνδρια, όσο και στα μπλε λιποκύτταρα (λιποκύτταρα με χαμηλότερη δραστηριότητα UCP-1 σε σχέση με τα καφέ λιποκύτταρα). Αν και τα λιποκύτταρα αυτά έχουν προταθεί ως θεραπευτικοί στόχοι για την αντιμετώπιση των μεταβολικών διαταραχών, τα αποτελέσματα των θεραπειών με βάση τα λιποκύτταρα στον άνθρωπο παραμένουν ασαφή. Σε μια μελέτη οι ερευνητές κατασκεύασαν ανθρώπινα καφέ λιποκύτταρα από λευκά λιποκύτταρα με την τεχνολογία CRISPR/Cas9-SAM-gRNA και ο στόχος τους ήταν ο προσδιορισμός των επιδράσεων αυτών των ανθρώπινων καφέ λιποκυττάρων (human brown-like, HUMBLE) στον μεταβολισμό της γλυκόζης σε όλο το σώμα και στη θερμογένεση σε παχύσαρκα ποντίκια. Μια άλλη παραλλαγή ανάλυσης CRISPR είναι το σύστημα που ενεργοποιείται συνεργικά από έναν διαμεσολαβητή (synergistic activation mediator, SAM), όπου το dCas9 συνδυάζεται με μια πρωτεΐνη σύντηξης η οποία αποτελείται από δύο μεταγραφικούς τομείς ενεργοποίησης, τον πυρηνικό παράγοντα κ-B (NF-κB) και τον παράγοντα θερμοπληξίας 1, για τη συνεργιστική ενίσχυση της μεταγραφής. Ωστόσο, οι ερευνητές, εκτός από τον χαρακτηρισμό αυτών των ανθρώπινων κυττάρων που έχουν σχεδιαστεί με την τεχνολογία CRISPR, μελέτησαν επίσης σε παχύσαρκα ποντίκια τις δυνατότητες των συγκεκριμένων κυττάρων για τη θεραπεία της παχυσαρκίας και των μεταβολικών διαταραχών. Τα παχύσαρκα ποντίκια που έλαβαν HUMBLE κυτταρικά μοσχεύματα παρουσίασαν σταθερή βελτίωση στην ανοχή στη γλυκόζη και στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, καθώς και αυξημένη ενεργειακή δαπάνη. Μηχανιστικά, ο αυξημένος μεταβολισμός αργινίνης/νιτρικού οξειδίου σε HUMBLE λιποκύτταρα προήγαγε την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου, που μεταφέρθηκε από S-νιτροζοθειόλες και νιτρώδη στα ερυθρά αιμοσφαίρια για να ενεργοποιήσει το ενδογενές καφέ λίπος και βελτίωσε την ομοιόσταση της γλυκόζης στα ποντίκια. Συνολικά, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν τη χρησιμότητα της εφαρμογής της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 για την κατασκευή ανθρώπινων λιποκυττάρων με φαινότυπο που ομοιάζει με το καφέ λίπος. Νέες πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις ενδέχεται να μελετηθούν με βάση τα εν λόγω κύτταρα για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της παχυσαρκίας και του διαβήτη.⁴⁶

Επιβλαβής για τη λειτουργία των β-κυττάρων του πα-

γκρέατος είναι και η υπερινσουλιναϊκή υπογλυκαιμία που προκαλείται από μεταλλάξεις στα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν το κανάλι του K_{ATP} ($K_{ATP}HI$).⁴⁷ Σε μια μελέτη, οι ερευνητές δημιούργησαν ένα μοντέλο $K_{ATP}HI$ χρησιμοποιώντας επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSCs). Οι ερευνητές έλαβαν iPSCs από άτομο που έφερε μια ομόζυγη μετάλλαξη ABCC8V187D, η οποία απενεργοποιεί τη ρυθμιστική υπομονάδα του υποδοχέα σουλφονυλουρίας (sulfonylurea receptor 1, SUR1) του καναλιού K_{ATP} . Επίσης, ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποίησαν τα διορθωμένα iPSCs ως προς τη μετάλλαξη ABCC8V187D με τη χρήση της τεχνολογίας του CRISPR/Cas9. Οι δύο αυτές ομάδες κυττάρων μελετήθηκαν *in vitro* και *in vivo*. Και στις δύο ομάδες τα βλαστοκύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε συστάδες νησίδων (SC-νησίδες) και εμφυτεύτηκαν σε NOD/SCID/gamma ποντίκια. Στην *in vitro* μελέτη τα μεταλλαγμένα και τα διορθωμένα iPSCs διαφοροποιήθηκαν αμφοτέρως προς την ενδοκρινική μοίρα, αλλά τα μεταλλαγμένα βλαστοκύτταρα δημιούργησαν 32% περισσότερα β-κύτταρα (SC-β-κύτταρα) σε σύγκριση με τα διορθωμένα iPSCs (64,6% έναντι 49%, $p=0,02$) και 26% λιγότερα κύτταρα που ομοιάζουν με α-κύτταρα (16,1% έναντι 21,8%, $p=0,01$). Τα μεταλλαγμένα iPSCs κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν κατά 61% περισσότερο έναντι των διορθωμένων iPSCs (1,23% έναντι 0,76%, $p=0,006$). Στα μεταλλαγμένα iPSCs κύτταρα η έκκριση της ινσουλίνης ήταν 3,2 φορές μεγαλύτερη σε συνθήκες χαμηλής γλυκόζης (0,0174% έναντι 0,0054%/min, $p=0,0021$) και δεν ανταποκρίθηκαν σε φάρμακα που δρουν στο κανάλι K_{ATP} *in vitro*. Στην *in vivo* μελέτη, οι ποντικοί που έφεραν τα μεταλλαγμένα iPSC παρουσίασαν κατά 38% χαμηλότερη γλυκόζη αίματος νηστείας συγκριτικά με τα διορθωμένα iPSCs (4,8 έναντι 7,7 mmol/L, $p=0,009$) και τα μεταλλαγμένα iPSCs απέτυχαν να διακόψουν αποτελεσματικά την έκκριση ινσουλίνης κατά τη διάρκεια της επαγόμενης υπογλυκαιμίας. Οι ερευνητές δημιούργησαν ένα μοντέλο που ανακεφαλαιώνει τη γνωστή παθοφυσιολογία του $K_{ATP}HI$ τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μοντέλα. Το συγκεκριμένο μοντέλο παρέχει τη δυνατότητα διεξαγωγής περαιτέρω μελετών για την κατανόηση και την κλινική διαχείριση του καναλιού $K_{ATP}HI$ χωρίς την ανάγκη λήψης πρωτογενών κυττάρων.⁴⁷

Η διαφοροποίηση των β-κυττάρων ώστε να είναι ικανά να παράγουν ινσουλίνη από iPSCs προερχόμενα από άτομα με ΣΔ υπόσχεται θεραπευτικά αποτελέσματα, αντικαθιστώντας τα μη λειτουργικά με λειτουργικά κύτταρα.⁴⁸ Ωστόσο, οι τρέχουσες προσεγγίσεις που έχουν γίνει σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα χαρακτηρίζονται από μεγάλο ποσοστό αποτυχίας. Ερευνητές χρησιμοποίησαν το σύστημα CRISPR/Cas9 για να διορθώσουν την παθογόνο παραλλαγή στο σύνδρομο Wolfram 1 σε iPSC που προέρχονται από άτομο

με σύνδρομο Wolfram. Τα διορθωμένα WS SC-β-κύτταρα μεταμοσχεύτηκαν σε διαβητικά ποντίκια. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν υψηλά ποσοστά έκκρισης της ινσουλίνης ως απόκριση στη γλυκόζη και αναστροφή του προϋπάρχοντος διαβήτη στα ποντίκια. Η μεταγραφομική ανάλυση έδειξε ότι τα διορθωμένα SC-β κύτταρα εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης και μείωση της έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με το stress του ενδοπλασματικού δικτύου. Η διόρθωση CRISPR/Cas9 μιας παραλλαγής γονιδίου που προκαλεί ΣΔ επιτρέπει την ισχυρή διαφοροποίηση των αυτόλογων κυττάρων SC-β και μπορεί να αναστρέψει τον διαβήτη σε ζωικό μοντέλο.⁴⁸

Σε μια μελέτη, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι ένα σπάνιο αλληλόμορφο στους κατοίκους της δυτικής Φινλανδίας φάνηκε να προστατεύει από τον ΣΔ2.⁴⁹ Το σπάνιο αυτό απώλειας λειτουργίας αλληλόμορφο (p.Arg138*) στο γονίδιο *SLC30A8* κωδικοποιεί τον μεταφορέα ψευδαργύρου 8 (ZnT8). Οι ερευνητές εντόπισαν φορείς του συγκεκριμένου αλληλόμορφου και διαπίστωσαν ότι η προστασία σχετίστηκε με καλύτερη έκκριση της ινσουλίνης λόγω ενισχυμένης ανταπόκρισης στη γλυκόζη και μετατροπή της προϊνσουλίνης, ιδιαίτερα σε σύγκριση με άτομα τα οποία φέρουν ένα κοινό αλληλόμορφο κινδύνου για ΣΔ2 στο *SLC30A8*, το p.Arg325. Οι ερευνητές, στη συνέχεια, με τη χρήση της τεχνολογίας του CRISPR/Cas9 σε ανθρώπινα iPSC έδειξαν ότι το αλληλόμορφο p.Arg138* έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση *SLC30A8* λόγω απλοανεπάρκειας. Στα ανθρώπινα β-κύτταρα η απώλεια του *SLC30A8* οδήγησε σε αυξημένη ανταπόκριση στη γλυκόζη και σε μειωμένη λειτουργία του καναλιού K_{ATP} , αποτελέσματα που είναι παρόμοια με τα μεμονωμένα νησίδα από φορείς του προστατευτικού αλληλόμορφου για ΣΔ2 p.Trp325. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν τον ZnT8 ως ελκυστικό στόχο για τη θεραπεία του ΣΔ2, επιδιώκοντας τη διατήρηση της ικανότητας έκκρισης της ινσουλίνης.⁴⁹

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων της ινσουλίνης είναι η κύρια αιτία νεογενικού ΣΔ.⁵⁰ Πιθανόν να οδηγήσουν σε λανθασμένη αναδίπλωση προϊνσουλίνης και παραμονή της στο ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmic reticulum, ER), γεγονός που οδηγεί σε αυξημένο ER-stress, ικανό να πυροδοτήσει την απόπτωση των β-κυττάρων. Στον άνθρωπο, οι μηχανισμοί που υπόκεινται της δυσλειτουργίας των β-κυττάρων παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ασαφείς. Σε μια μελέτη βρέθηκε ότι η λανθασμένη αναδίπλωση της προϊνσουλίνης μειώνει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των β-κυττάρων χωρίς όμως αύξηση της απόπτωσης. Οι ερευνητές δημιούργησαν επαγόμενα iPSCs από άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της *INS* και με τη χρήση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 διαφοροποίησαν τα iPSCs σε κύτταρα που είχαν τα χαρακτηριστικά των β-κυττάρων. Με

τη μέθοδο προσδιορισμού αλληλουχίας RNA ενός μόνο κυττάρου διαπίστωσαν αυξημένο ER-stress και μειωμένο πολλαπλασιασμό σε μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *INS* κύτταρα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στη συνέχεια, τα μεταλλαγμένα κύτταρα μεταμοσχεύτηκαν σε ποντίκια. Κατά τη μεταμόσχευση, τα μεταλλαγμένα *INS* νησίδια παρουσίασαν μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και αυξημένο ER-stress. Το μέγεθος των κυττάρων, η έκφραση της σηματοδότησης συμπλόκου-1 του στόχου ραπαμυκίνης στα θηλαστικά (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1) και των υπομονάδων αναπνευστικής αλυσίδας μειώθηκαν. Ωστόσο, η απόπτωση δεν αυξήθηκε καθόλου. Η σηματοδότηση mTORC1 είναι απαραίτητη για τη σωστή μεταγεννητική ανάπτυξη και ωρίμανση των β-κυττάρων.⁵¹ Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης αποδεικνύουν ότι οι μεταλλάξεις *INS* που σχετίζονται με τον νεογνικό ΣΔ οδηγούν σε μη φυσιολογική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των β-κυττάρων, συμβάλλοντας στην εμφάνιση του ΣΔ.⁵⁰

Μια κύρια αιτία εξέλιξης της νόσου στον ΣΔ2 είναι η δυσλειτουργία των β-κυττάρων λόγω του φλεγμονώδους stress και της αντίστασης στην ινσουλίνη.⁵² Ωστόσο, με τη φυσική ιστορία της νόσου, κάποιου βαθμού απώλεια β-κυττάρων συμβαίνει και στον ΣΔ2. Κατά συνέπεια, η πρόληψη της απόπτωσης των β-κυττάρων σε άτομα με ΣΔ2 είναι μια σημαντική θεραπευτική πρόκληση. Ο υποδοχέας της βιταμίνης D (vitamin D receptor, VDR) έχει προταθεί ως ένας βασικός ρυθμιστής της φλεγμονής και της επιβίωσης των β-κυττάρων. Η αναγνώριση μιας ακετυλιωμένης λυσίνης στον VDR από τις πρωτεΐνες BRD7 και BRD9 κατευθύνει τη σύνδεση του υποδοχέα με τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης PBAF και BAF, αντίστοιχα. Μηχανιστικά, ο συνδέτης προάγει τη σύνδεση VDR με το PBAF και προκαλεί αλλαγές σε όλο το γονιδίωμα και στη χρωματίνη, με αποτέλεσμα μια αντιφλεγμονώδη απόκριση. Είναι σημαντικό ότι η φαρμακολογική αναστολή του BRD9 προάγει τη σύνδεση PBAF-VDR για την αποκατάσταση της λειτουργίας των β-κυττάρων και τη βελτίωση της υπεργλυκαιμίας σε μοντέλα ΣΔ2 ποντικού. Αυτή η έρευνα αποκαλύπτει μια μη αναγνωρισμένη μεταγραφή που εξαρτάται από τον VDR, προάγει την επιβίωση των β-κυττάρων και προσδιορίζει τη συσχέτιση VDR:PBAF/BAF, χαρακτηρίζοντάς την ως δυνητικό θεραπευτικό στόχο για τον ΣΔ2.⁵²

Σε μια άλλη μελέτη αναλύθηκε το μεταγράφημα 39.905 κυττάρων μεμονωμένων νησίδων από 9 δότες και παρατηρήθηκαν διακριτές τροχιές ετερογένειας β-κυττάρων που σχετίζονται με την παχυσαρκία και τον ΣΔ2.²⁹ Ως εκ τούτου, οι ερευνητές ανέπτυξαν τον RePACT, έναν ευαίσθητο αλγόριθμο ανάλυσης ενός μόνο κυττάρου για τον εντοπισμό των υπεύθυνων γονιδίων για την εξέλιξη της νόσου της παχυσαρκίας και του ΣΔ2. Οι ερευνητές έκαναν

χαρτογράφηση του γονιδιώματος στα β-κύτταρα, αλλά προσδιορίστηκαν και με ανάλυση CRISPR τα υπεύθυνα γονίδια της νόσου στο μονοπάτι ρύθμισης της ινσουλίνης. Η εν λόγω ολοκληρωμένη ανάλυση αποκάλυψε τους μη αναγνωρισμένους προηγούμενως ρόλους του συμπλέγματος της πρωτεΐνης συνεσίνης και του συμπλέγματος ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης NuA4/Tip60 στη ρύθμιση της μεταγραφής και της απελευθέρωσης της ινσουλίνης. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε τη δύναμη του συνδυασμού της ανάλυσης CRISPR ως προς την ετερογένεια της αιτιολογίας πολύπλοκων ασθενειών.²⁹

Ο ΣΔ τύπου 1 (ΣΔ1) προκαλείται από την αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος.⁵³ Τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε β-κύτταρα, αυξάνοντας την προοπτική μιας θεραπείας κυτταρικής υποκατάστασης για τον ΣΔ1. Ωστόσο, η αυτοανοσία θα κατέστρεφε γρήγορα τα πρόσφατα μεταμοσχευμένα β-κύτταρα. Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CRISPR/Cas9 σε κλίμακα γονιδιώματος σε ένα μοντέλο ποντικού για ΣΔ1, φάνηκε ότι η διαγραφή του RNLS, ενός υποψήφιου γονιδίου *GWAS* για τον ΣΔ1, κατέστησε τα β-κύτταρα ανθεκτικά στην αυτοάνοση θανάτωση. Η μοντελοποίηση με βάση τη δομή προσδιόρισε το εγκεκριμένο από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (US Food and Drug Administration, FDA) φάρμακο παργουλίνη ως πιθανό αναστολέα RNLS. Η από του στόματος θεραπεία με παργουλίνη προστάτευσε τα μεταμοσχευμένα β-κύτταρα σε διαβητικούς ποντικούς, οδηγώντας σε αναστροφή της νόσου. Επί πλέον, η παργουλίνη θα μπορούσε να αποτρέψει ή να επιβραδύνει την εμφάνιση διαβήτη σε πολλά μοντέλα ποντικών για ΣΔ1. Τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης προσδιορίζουν τη δράση του RNLS ως τροποποιητή της ευπάθειας των β-κυττάρων και ως πιθανό θεραπευτικό στόχο για την αποτροπή της απώλειας β-κυττάρων στον ΣΔ1.⁵³

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Υπάρχουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα στην παθοφυσιολογία του ΣΔ που μπορούν μέσω της τεχνολογίας του συστήματος CRISPR/Cas9 να απαντηθούν. Για παράδειγμα, ο πολλαπλασιασμός, η δυσλειτουργία και ο κυτταρικός θάνατος των β-κυττάρων είναι σημαντικά θέματα στην έρευνα για τον ΣΔ. Μπορούν να εφαρμοστούν αναλύσεις CRISPR σε όλο το γονιδίωμα για τη μελέτη του μηχανισμού των λιποκυττάρων που ενεργοποιείται από τη γλυκόζη ή το ER-stress, το οποίο προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο των β-κυττάρων. Οι αναλύσεις CRISPR πιστεύεται ότι είναι απαραίτητες και για τους δύο τύπους του διαβήτη. Θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν αναλύσεις CRISPR για τη μελέτη των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων ή

τη διαφοροποίηση πολυδύναμων βλαστοκυττάρων σε παγκρεατικά β-κύτταρα ή ακόμη και τη διαφοροποίηση άλλων τύπων κυττάρων σε παγκρεατικά β-κύτταρα. Η μελέτη της λειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος με αναλύσεις CRISPR είναι τεχνικά δύσκολη, επειδή η έκκριση ινσουλίνης δεν είναι μια αυτόνομη και ανεξάρτητη λειτουργία, αλλά επηρεάζεται από τη δράση διαφόρων κυττάρων. Ωστόσο, οι αναλύσεις CRISPR μπορούν να σχεδιαστούν προσεκτικά έτσι ώστε η μέτρηση της ινσουλίνης να γίνει σε ένα ενδιάμεσο βήμα κατά την έκκρισή της. Οι αναλύσεις CRISPR θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της πρόσληψης βασικών μεταβολιτών από μεταβολικά όργανα/ιστούς, για παράδειγμα χρησιμοποιώντας ένα φθορίζον ανάλογο γλυκόζης, όπως το 2-NBDG, για τη μελέτη της πρόσληψης γλυκόζης από τα λιποκύτταρα, τους μυς ή και τα ηπατικά κύτταρα. Στην έρευνα για τη διαφοροποίηση των καφέ λιποκυττάρων, το επίπεδο έκφρασης του UCP-1 με ένα φθορίζον μόριο θα μπορούσε να χρησιμεύσει για τη χρήση μιας ανάλυσης CRISPR. Σχετικά με τις επιπλοκές

του ΣΔ, η δυσλειτουργία των κυττάρων και η απόπτωση που προκαλείται από την υπεργλυκαιμία στο αγγειακό ενδοθήλιο, στα νεφρικά ποδοκύτταρα και στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς μπορούν επίσης να μοντελοποιηθούν *in vitro* και να αποτελέσουν ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον πεδίο έρευνας για τη χρήση της ανάλυσης CRISPR.

Συνοπτικά, υπάρχουν ακόμη πολλά αναπάντητα ερευνητικά ερωτήματα τα οποία σχετίζονται με τον ΣΔ και τις επιπλοκές του που μπορούν να διερευνηθούν με ένα σύστημα CRISPR/Cas. Οι πόροι και τα εργαλεία είναι όλα άμεσα διαθέσιμα, αλλά οι ερευνητές πρέπει να σχεδιάσουν κατάλληλες αναλύσεις και στρατηγικές επιλογής των κυττάρων. Είναι σημαντικό να υπάρξει ανάπτυξη κατευθυντήριων γραμμών και κανονιστικών πλαισίων που θα μπορούν να συνδράμουν στην αξιοποίηση του τεράστιου δυναμικού της τεχνολογίας CRISPR/Cas9, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τους προβλεπόμενους κινδύνους πιθανής κατάχρησης και διατηρώντας τα όρια που επιβάλλει η βιοηθική.

ABSTRACT

Application of CRISPR/Cas9 technology on research in diabetes mellitus and obesity

I.A. ANASTASIOU, E. REBELOS, A. TENTOLOURI, E. APOSTOLOPOULOU, N. TENTOLOURIS

First Department of Propedeutic Internal Medicine and Diabetes Center, "Laiko" General Hospital, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2025, 42(3):330–340

The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) associated proteins (CRISPR/Cas9) genetic intervention method was one of the greatest scientific discoveries of the last decade. The highly efficient and precise ability to edit the genome with CRISPR/Cas9 technology has great therapeutic value and benefits, providing basic science with an additional research tool. CRISPR technology has been used mainly in cancer biology, virology, and basic cell biology; however, in diabetes research there has been limited work. One possible reason for this is that diabetes and obesity research is more complex because it involves many organs and cell types. However, many unanswered questions can still be answered using the CRISPR/Cas9 genetic intervention method. In this review, we summarize the current research data and results available using CRISPR/Cas9 and we try to provide an insight on how it can be used in diabetes and obesity research in the future.

Key words: Beta cells, Cas9, CRISPR/Cas, Diabetes mellitus, Obesity

Βιβλιογραφία

1. CHEN H, LIU H, PENG X. Reverse genetics in virology: A double edged sword. *Biosaf Health* 2022, 4:303–313
2. ALI KHAN A, RAESS M, DE ANGELIS MH. Moving forward with forward genetics: A summary of the INFRAFRONTIER Forward Genetics Panel Discussion. *F1000Res* 2021, 10:456
3. SIOUD M. RNA and CRISPR interferences: Past, present, and future perspectives. *Methods Mol Biol* 2020, 2115:1–22
4. YI P, MORROW N. Applying CRISPR screen in diabetes research. *Diabetes* 2021, 70:1962–1969
5. ISHINO Y, KRUPOVIC M, FORTERRER P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *J Bacteriol* 2018, 200:e00580-17
6. ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, AMEMURA M, NAKATA A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phos-

- phatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 1987, 169:5429–5433
7. JIANG F, DOUDNA JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys* 2017, 46:505–529
 8. SINKUNAS T, GASIUNAS G, FREMAUX C, BARRANGOU R, HORVATH P, SIKSNYS V. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *Embo J* 2011, 30:1335–1342
 9. JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012, 337:816–821
 10. RAN FA, HSU PD, WRIGHT J, AGARWALA V, SCOTT DA, ZHANG F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013, 8:2281–2308
 11. REDMAN M, KING A, WATSON C, KING D. What is CRISPR/Cas9? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2016, 101:213–215
 12. XU Y, LIZ. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J* 2020, 18:2401–2415
 13. UYHAZI KE, BENNETT J. A CRISPR view of the 2020 nobel prize in chemistry. *J Clin Invest* 2021, 131:e145214
 14. DOUDNA JA, CHARPENTIER E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014, 346:1258096
 15. GUPTA D, BHATTACHARJEE O, MANDAL D, SEN MK, DEY D, DASGUPTA A ET AL. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sci* 2019, 232:116636
 16. BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, RICHARDS M, BOYAVAL P, MOINEAU S ET AL. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007, 315:1709–1712
 17. BARMAN NC, KHAN NM, ISLAM M, NAIN Z, ROY RK, HAQUE A ET AL. CRISPR-Cas9: A promising genome editing therapeutic tool for Alzheimer's disease – a narrative review. *Neurol Ther* 2020, 9:419–434
 18. POURCEL C, SALVIGNOL G, VERGNAUD G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading)* 2005, 151:653–663
 19. YOSEF I, GOREN MG, QIMRON U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2012, 40:5569–5576
 20. GARNEAU JE, DUPUIS MÈ, VILLION M, ROMERO DA, BARRANGOU R, BOYAVAL P ET AL. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 2010, 468:67–71
 21. BARRANGOU R, BIRMINGHAM A, WIEMANN S, BEIJERSBERGEN RL, HORNUNG V, VAN BRABANT SMITH A. Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: Lessons learned from RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2015, 43:3407–3419
 22. BOCK C, DATLINGER P, CHARDON F, COELHO MA, DONG MB, LAWSON KA ET AL. High-content CRISPR screening. *Nat Rev Methods Primers* 2022, 2:9
 23. JOUNG J, KONERMANN S, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, PLATT RJ, BRIGHAM MD ET AL. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nat Protoc* 2017, 12:828–863
 24. SANJANA NE, SHALEM O, ZHANG F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 2014, 11:783–784
 25. DOENCH JG, FUSI N, SULLENDER M, HEGDE M, VAIMBERG EW, DONOVAN KF ET AL. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 2016, 34:184–191
 26. KONERMANN S, BRIGHAM MD, TREVINO AE, JOUNG J, ABUDAYYEH OO, BARCENA C ET AL. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 2015, 517:583–588
 27. ARAKAWA H. A method to convert mRNA into a gRNA library for CRISPR/Cas9 editing of any organism. *Sci Adv* 2016, 2:e1600699
 28. HART T, CHANDRASHEKHAR M, AREGGER M, STEINHART Z, BROWN KR, MACLEOD G ET AL. High-resolution CRISPR screens reveal fitness genes and genotype-specific cancer liabilities. *Cell* 2015, 163:1515–1526
 29. FANG Z, WENG C, LI H, TAO R, MAI W, LIU X ET AL. Single-cell heterogeneity analysis and CRISPR screen identify key β -cell-specific disease genes. *Cell Rep* 2019, 26:3132–3144.e7
 30. PANGANIBAN RA, PARK HR, SUN M, SHUMYATCHER M, HIMES BE, LU Q. Genome-wide CRISPR screen identifies suppressors of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019, 116:13384–13393
 31. HANEY MS, BOHLEN CJ, MORGENS DW, OUSEY JA, BARKAL AA, TSUI CK ET AL. Identification of phagocytosis regulators using magnetic genome-wide CRISPR screens. *Nat Genet* 2018, 50:1716–1727
 32. PARNAS O, JOVANOVIĆ M, EISENHAURE TM, HERBST RH, DIXIT A, YE CJ ET AL. A genome-wide CRISPR screen in primary immune cells to dissect regulatory networks. *Cell* 2015, 162:675–686
 33. ZHANG B. CRISPR/Cas gene therapy. *J Cell Physiol* 2021, 236:2459–2481
 34. RASUL MF, HUSSEN BM, SALIHI A, ISMAEL BS, JALAL PJ, ZANICHELLI A ET AL. Strategies to overcome the main challenges of the use of CRISPR/Cas9 as a replacement for cancer therapy. *Mol Cancer* 2022, 21:64
 35. AYANOĞLU FB, ELÇİN AE, ELÇİN YM. Bioethical issues in genome editing by CRISPR-Cas9 technology. *Turk J Biol* 2020, 44:110–120
 36. KAUR S, ALI A, AHMAD U, SIAHBALAEI Y, PANDEY AK, SINGH B. Role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in common migraine. *Egypt J Neurol Psychiatry Neurosurg* 2019, 55:47
 37. ZHU QM, KO KA, TURE S, MASTRANGELO MA, CHEN MH, JOHNSON AD ET AL. Novel thrombotic function of a human SNP in STXBP5 revealed by CRISPR/Cas9 gene editing in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017, 37:264–270
 38. GUO MH, NANDAKUMAR SK, ULIRSCH JC, ZEKAVAT SM, BUENROSTRO JD, NATARAJAN P ET AL. Comprehensive population-based genome sequencing provides insight into hematopoietic regulatory mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017, 114:E327–E336
 39. COURTNEY DG, MOORE JE, ATKINSON SD, MAURIZI E, ALLEN EHA, PEDRIOLI DML ET AL. CRISPR/Cas9 DNA cleavage at SNP-derived PAM enables both *in vitro* and *in vivo* *KRT12* mutation-specific targeting. *Gene Ther* 2016, 23:108–112

40. HECKL D, KOWALCZYK MS, YUDOVICH D, BELIZAIRE R, PURAM RV, McCONKEY ME ET AL. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR/Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol* 2014, 32:941–946
41. XUE W, CHEN S, YIN H, TAMMELA T, PAPAGIANNAKOPOULOS T, JOSHI NS ET AL. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* 2014, 514:380–384
42. PAPASAVVA P, KLEANTHOUS M, LEDERER CW. Rare opportunities: CRISPR/Cas-based therapy development for rare genetic diseases. *Mol Diagn Ther* 2019, 23:201–222
43. JOKL EJ, HUGHES GL, CRACKNELL T, POWNALL ME, BLANCO G. Transcriptional upregulation of *BAG3*, a chaperone-assisted selective autophagy factor, in animal models of KY-deficient hereditary myopathy. *Dis Model Mech* 2018, 11:dmm033225
44. YAN S, TU Z, LIU Z, FAN N, YANG H, YANG S ET AL. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Cell* 2018, 173:989–1002.e13
45. GROTZ AK, ABAITUA F, NAVARRO-GUERRERO E, HASTOY B, EBNER D, GLOYN AL. A CRISPR/Cas9 genome editing pipeline in the EndoC-βH cell line to study genes implicated in beta cell function. *Wellcome Open Res* 2020, 4:150
46. WANG CH, LUNDH M, FU A, KRISZT R, HUANG TL, LYNES MD ET AL. CRISPR-engineered human brown-like adipocytes prevent diet-induced obesity and ameliorate metabolic syndrome in mice. *Sci Transl Med* 2020, 12:eaaz8664
47. LITHOVIUS V, SAARIMÄKI-VIRE J, BALBOA D, IBRAHIM H, MONTASER H, BARSBY T ET AL. SUR1-mutant iPSC cell-derived islets recapitulate the pathophysiology of congenital hyperinsulinism. *Diabetologia* 2021, 64:630–640
48. MAXWELL KG, AUGSORNWORAWAT P, VELAZCO-CRUZ L, KIM MH, ASADA R, HOGREBE NJ ET AL. Gene-edited human stem cell-derived β cells from a patient with monogenic diabetes reverse pre-existing diabetes in mice. *Sci Transl Med* 2020, 12:eaax9106
49. DWIVEDI OP, LEHTOVIRTA M, HASTOY B, CHANDRA V, KRENTZ NAJ, KLEINER S ET AL. Loss of Znf8 function protects against diabetes by enhanced insulin secretion. *Nat Genet* 2019, 51:1596–1606
50. BALBOA D, SAARIMÄKI-VIRE J, BORSHAGOVSKI D, SURVILA M, LINDHOLM P, GALLI E ET AL. Insulin mutations impair beta-cell development in a patient-derived iPSC model of neonatal diabetes. *Elife* 2018, 7:e38519
51. NI Q, GU Y, XIE Y, YIN Q, ZHANG H, NIE A ET AL. Raptor regulates functional maturation of murine beta cells. *Nat Commun* 2017, 8:15755
52. WEI Z, YOSHIHARA E, HE N, HAH N, FAN W, PINTO AFM ET AL. Vitamin D switches BAF complexes to protect β cells. *Cell* 2018, 173:1135–1149.e15
53. CAI EP, ISHIKAWA Y, ZHANG W, LEITE NC, LI J, HOU S ET AL. Genome-scale *in vivo* CRISPR screen identifies RNLS as a target for beta cell protection in type 1 diabetes. *Nat Metab* 2020, 2:934–945

Corresponding author:

I.A. Anastasiou, First Department of Propedeutic Internal Medicine and Diabetes Center, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, "Laiko" General Hospital, 75 Mikras Asias street, 115 27 Athens, Greece
e-mail: anastasiouiwna@gmail.com