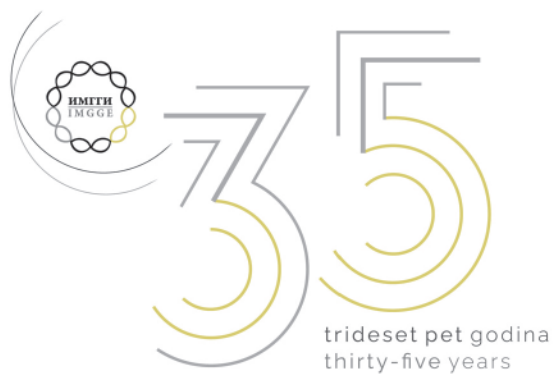


Broj 1 • septembar 2021. N° 1 • September 2021.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**  
Trends in **Molecular Biology**



Beograd • Belgrade • 2021.  
IMGGI • IMGGE

# Sadržaj • Content

Personalizovana medicina i COVID-19: značaj genomskog profilisanja pacijenata i bioinformatike <b>Branka Zukić, Biljana Stanković, Nikola Kotur</b>	6	Personalized medicine and COVID-19: the importance of genomic host profiling and bioinformatics
Izotermalna amplifikacija posredovana petljom (LAMP) kao metoda za terensku detekciju SARS-CoV-2 virusa <b>Mila Djisalov, Teodora Knežić, Ljiljana Janjušević, Željko D. Popović, Petar Kosijer, Ivana Gadjanski</b>	21	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a point-of-care SARS-CoV-2 detection method
CRISPR-Cas9 tehnologija: od osnovnih istraživanja do kliničke prakse <b>Marko Panić</b>	33	CRISPR-Cas9 technology: from basic research to clinical application
Primena CRISPR/Cas9 tehnologije u otkrivanju novih molekularnih terapeutika <b>Anita Skakić, Maja Stojilković</b>	42	Application of CRISPR/Cas9 technology in the discovery of new molecular therapeutics
Nova paradigma u dijagnostici retkih bolesti <b>Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dušan Keckarević</b>	54	Diagnostics of rare diseases: New paradigm
Genetička i epigenetička karakterizacija varijantnih <i>DMPK</i> ekspanzija kao modifikatora fenotipa miotonične distrofije tipa 1 <b>Jovan Pešović, Stojan Perić, Lana Radenković, Vidosava Rakočević-Stojanović, Dušanka Savić-Pavićević</b>	60	Genetic and epigenetic characterization of variant <i>DMPK</i> expansions as a modifier of phenotype in myotonic dystrophy type 1
Molekularna osnova primarne cilijarne diskinezije <b>Marina Anđelković</b>	71	Molecular basis of primary ciliary dyskinesia
Molekularna osnova monogenetskog dijabetesa <b>Jovana Komazec, Milena Ugrin</b>	84	The Molecular Basis of Monogenic Diabetes
Diferencijalna dijagnoza eozinofilnog infiltrata u sluznici jednjaka primenom molekularno-bioloških metoda <b>Nina Ristić, Tijana Išić Denčić, Radmila Janković</b>	96	Differential diagnosis of eosinophilic infiltrate in esophageal mucosa by applying molecular biology methods
Molekularni markeri u sistemskoj sklerozii: geni kandidati i terapijski modaliteti <b>Vesna Spasovski, Miša Vreća</b>	107	Molecular markers in systemic sclerosis: candidate genes and therapeutic modalities
Duga nekodirajuća RNK GAS5 kao novi biomarker u onkologiji <b>Vladimir Gašić, Nataša Tošić</b>	113	Long noncoding RNA GAS5 as a new biomarker in oncology
Prediktivna i prognostička uloga gena p16INK4a, p14ARF i KRAS u karcinomu rektuma čoveka <b>Bojana Kožik, Milena Krajnović, Nikola Kokanov</b>	123	Predictive and prognostic role of p16INK4a, p14ARF and KRAS genes in human rectal carcinoma
Savremena molekularno-biološka ispitivanja prognostičkih faktora papilarnog tiroidnog karcinoma i mogućnost njihove primene u kliničkoj praksi <b>Ilona Đorić, Jelena Janković Miljuš, Sonja Šelemetjev</b>	133	Contemporary molecular-biological investigations of papillary thyroid carcinoma prognostic factors and their potential for application in clinical practice
Nekodirajuće RNK kao perspektiva u dijagnostici i lečenju kardiovaskularnih bolesti <b>Ljiljana Rakićević</b>	146	Non-coding RNAs as a prospect in diagnostics and treatment of cardiovascular diseases
Biološko delovanje polifenola nara na komponente metaboličkog sindroma: implikacije na oksidativni stres <b>Milica Kojadinović i Aleksandra Arsić</b>	152	Biological effect of pomegranate polyphenols on the components of metabolic syndrome: implications on oxidative stress
Biogeni utišavači virulencije vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <b>Milka Malešević, Branko Jovčić</b>	166	Biogenic silencers of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> virulence
Silicijum kao antistres element za biljke izložene toksičnim koncentracijama bakra <b>Dragana Bosnić, Dragana Nikolić, Jelena Samardžić</b>	180	Silicon as an anti-stress element for plants exposed to toxic copper

## **PREDGOVOR**

Molekularna biologija doživljava svoj procvat u XXI veku. Od naučne discipline koja je početkom 1930-ih bila u povojima, i koja je nastojala da objedini genetiku, biohemiju i biofiziku kako bi rasvetlila tajne života, izrasla je u nauku čija su postignuća doprinela velikom napretku u medicini, veterini, poljoprivredi i farmaciji. Uz informaciono komunikacione tehnologije, molekularna biologija je najperspektivnija oblast istraživanja, od koje se očekuje da značajno doprinese boljitku života ljudi u budućnosti.

U Srbiji je molekularna biologija prepoznata relativno rano, pre nego na mnogim drugim meridijanima. Već u školskoj 1972/73. se na Biološkom fakultetu u Beogradu (tada Prirodno-matematički fakultet) osniva smer- molekularna biologija i fiziologija. U našoj zemlji se tako edukuju generacije molekularnih biologa već pola veka. I veliki naučni instituti u Srbiji osnivaju laboratorije u kojima istraživanja prate, a ponekad i predvode, svetske trendove u molekularnoj biologiji. Jedna od tih naučnih institucija je Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), osnovan 1986. godine u Beogradu. Već 35 godina naučnici iz IMGGI stavljaju najmodernije teme iz molekularne biologije u fokus svojih istraživanja.

Ovaj Tematski zbornik ima za cilj da prikaže aktuelne teme i postignuća iz oblasti molekularne biologije u prethodnoj, 2020. godini i da svedoči o tome kako su naučnici u Srbiji učestvovali u tim svetskim trendovima. Poglavlja su rezultat doktorskih teza mladih molekularnih biologa ali i prikaz aktuelnih istraživanja u kojima je istaknut doprinos naših naučnika. Od godine 2020. se očekivao veliki napredak u mnogim disciplinama zahvaljujući novim saznanjima iz molekularne biologije. Početak godine je doneo pandemiju KOVID-19 bolesti, koja je imala sve karakteristike epidemija iz ranijih vekova. Bili smo na pragu velikog razočaranja. A onda je molekularna biologija upotrebila sve svoje kapacitete, tako što je omogućila karakterizaciju virusa, uzročnika bolesti, za izuzetno kratko vreme. Iz tog razloga metode za detekciju virusa su bile razvijene u rekordnom roku, te je brza i efikasna dijagnostika postala dostupna lekarima. A potom su se pojavile vakcine, rezultat modernih metoda genetičkog inženjerstva. I tako je 2020. godina ipak bila jedinstvena u istoriji, jer je odgovor na epidemiju bio brz i efikasan, zahvaljujući, u velikoj meri, molekularnoj biologiji. Iste godine, Nobelova nagrada za hemiju je dodeljena metodi koja efikasno i tačno edituje humani genom. Vrata medicine budućnosti su se širom otvorila.

Ova sveska bi trebalo da bude prva u nizu godišnjih tematskih zbornika posvećenih aktuelnim temama iz molekularne biologije. Svesni smo kako će ovi rezultati izgledati za deceniju ili dve. Ali, ovo su „znakovi pored puta“ koje je naše vreme ostavilo, osvetljavajući put kojim se ide napred. Mi smo zadivljeni napretkom naše nauke, kad pogledamo u prošlost, ali smo i svesni koji su njeni dometi u odnosu na ono čemu nauka stremi. Radujemo se budućim sveskama i verujemo da će one otvarati nove perspektive i trasirati put napretka.

Nadamo se da će ovaj Tematski zbornik naći put do mladih ljudi, da će ih inspirisati da se opredele za naučni rad, posebno za molekularnu biologiju. Verujemo da će buduće generacije uvideti da naučni rad i u ovoj zemlji može dati doprinos svetskoj nauci a pri tome i dovesti do poboljšanja života ljudi u našoj zemlji. Od svih koji su učestvovali u stvaranju ovog svedočenja o našem vremenu, poruka za vas koji dolazite je:

„Hoćemo li na molekularnu?!“

**Sonja Pavlović**

## IZ RECENZIJ TEMATSKOG ZBORNIKA

### Trendovi u molekularnoj biologiji

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* oslikava trenutno stanje i fokus istraživanja u molekularnoj biologiji u Srbiji. Izabrane tematske oblasti i reprezentativni radovi jasno govore o mogućnostima i dometima ove naučne oblasti i spremnosti istraživača u Srbiji da prate trendove i savremene naučne pristupe.

Osim trenutno aktuelnog COVID-19, molekularna biologija je unapredila i obogatila istraživanja u medicini kroz oblast biomedicine. Težište ovog Tematskog zbornika je na rezultatima istraživanja molekularne osnove kompleksnih i retkih bolesti. Proučavanje prokariota dovelo je do mnogih fundamentalnih i revolucionarnih otkrića u molekularnoj biologiji, koja su otvorila put ka biotehnološkoj primeni. Jedno od takvih otkrića je i CRISPR/Cas9 tehnologija za editovanje genoma. Veoma važna oblast istraživanja je i potraga za inovativnim načinima kontrole infekcija izazvanih bakterijama koje su rezistentne na konvencionalne antibiotike. O ovim temama se takođe govori u Tematskom zborniku. Istraživanja u molekularnoj biologiji biljaka ne samo da su proširila znanja o ovim organizmima, već su otvorila put ka primeni savremenih metoda za poboljšanje osobina biljaka i povećanje prinosa. U tom smislu je veoma zanimljiv i ilustrativan rad koji je prikazan u ovom Zborniku.

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* jasno je ukazao na naučni i širi društveni značaj istraživanja u molekularnoj biologiji. Ovim prvim brojem nagoveštava se da će Zbornik ne samo pratiti i dokumentovati najznačajnija dostignuća u molekularnoj biologiji, već da će biti podstrek i inspiracija istraživačima u Srbiji.

#### **Prof. Svetlana Radović, redovni profesor Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu**

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji“ je sačinjen od 17 poglavlja u kojima su predstavljeni naučni rezultati iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije. Veliki broj poglavlja iz Zbornika je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. Doprinos koji je molekularna biologija dala modernoj medicini je izuzetno veliki. Danas su u kliničkoj praksi mnogobrojni dijagnostički, prognostički i terapijskih molekularni markeri. Posebno je značajno što je medicina u Srbiji pratila svetske trendove, i to zahvaljujući i velikim naporima molekularnih biologa u našoj zemlji.

Najbolji primer postignuća molekularne biomedicine je odgovor ove nauke na pandemiju COVID-19. Dijagnostika je omogućena uzuzetno brzo jer je molekularna biologija bila spremna za ovaj zadatak. Ipak je razvoj vakcina u fascinantnom roku najveće postignuće ove nauke. Molekularna biologija je pokazala svoju snagu u pravom trenutku i postala najznačajnija nauka u kriznim momentima za čovečanstvo, kako u svetu, tako i u našoj zemlji.

Sigurno je da će ovako koncipiran Tematski zbornik imati budućnost, jer je napredak medicine nemoguće zamisliti bez novih dostignuća molekularne biologije.

#### **Prof. dr Vesna Škodrić-Trifunović, redovni profesor Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu**

Ovaj Tematski zbornik kroz četiri celine daje pregled najznačajnijih ostvarenja u molekularnoj biologiji u svetu, a kojima se bave i istraživači u Srbiji. U okviru 17 preglednih radova prikazani su različiti rezultati - od onih koji su obeležili prethodnu godinu (posvećeni COVID-19 i CRISPR/Cas9 tehnologiji), preko novih dostignuća u biomedicini (retkih i kompleksnih bolesti), do molekularno bioloških istraživanja prokariota i biljaka.

Značaj ovog Zbornika je višestruk, ogleda se ne samo u činjenici da su najrelevantnija saznanja iz navedenih oblasti objedinjena i postala dostupna široj javnosti na maternjem jeziku, već i zbog toga što su radove napisali istraživači iz različitih naučnih instituta (6), fakulteta (3) i klinika (2) iz Srbije, u kojima se ta istraživanja aktivno sprovode. Naime, saznanja o SARS-CoV-2 koronavirusu, uzročniku nove bolesti COVID-19, se kontinuirano uvećavaju i veoma je važno što i naučnici iz naše zemlje daju doprinos u razumevanju ove pandemije. Isto se odnosi i na najnovije tehnologije za manipulaciju molekula DNK, koje su dovele do revolucionarnih pomaka u biomedicinskim naukama. Stoga, prikazana istraživanja molekularne osnove različitih bolesti najsavremenijim metodološkim pristupima, primena dobijenih rezultata u dijagnozi, preciznom predviđanju progresije bolesti i lečenju, kao i razvoju novih molekularnih terapeutika, daju realnu osnovu očekivanjima da će personalizovana medicina uskoro postati široko dostupna.

#### **Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu**

## CRISPR-Cas9 tehnologija: od osnovnih istraživanja do kliničke prakse

Marko Panić

Centar za humanu molekularnu genetiku, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, Beograd, Srbija

Kontakt: marko.panic@bio.bg.ac.rs

### Apstrakt

Tehnologije za manipulaciju molekula DNK su omogućile brojna otkrića i prodore u biomedicinskim naukama. Ipak, metode za uvođenje ciljanih promena u genomu su do skora bile relativno komplikovane i nepristupačne najvećem broju naučnika. Primenom CRISPR-Cas9 tehnologije počela je revolucija u biomedicinskim naukama zato što su metode za genomsko inženjerstvo postale dostupne gotovo svakoj laboratoriji. Ova tehnologija je prešla veliki put od osnovnih istraživanja u vezi sa prokariotskim genomima pre nekoliko decenija, preko otkrića mehanizma stečenog imuniteta bakterija, da bi danas postala dominantna tehnologija za genomsko inženjerstvo. Fokus ovog rada je na praktičnom aspektu primene CRISPR-Cas9 tehnologije i njenim poređenjem u odnosu na alternative za uvođenje dvolančanih prekida u genomu (TALEN i ZFN nukleazama). Detaljno će se obraditi upotreba CRISPR-Cas9 tehnologije u bazičnim (naučnim) istraživanjima i u medicini. Razmatraće se i svi nedostaci trenutnih tehnologija za genomsko inženjerstvo, uključujući uvođenje nespecifičnih promena u genomu i načini prevazilaženja ovih nedostataka. Kroz brojne primere upotrebe CRISPR-Cas9 tehnologije će biti približeno zašto je ova metoda značajna ne samo za biomedicinske nauke, već za celokupno društvo.

**Ključne reči:** genomsko inženjerstvo, CRISPR- Cas9, genska terapija

## CRISPR-Cas9 technology: from basic research to clinical application

Marko Panić

Center for human molecular genetics, University of Belgrade – Faculty of Biology, Belgrade, Serbia

Correspondence: marko.panic@bio.bg.ac.rs

### Abstract

Technologies for DNA manipulation have enabled numerous breakthroughs in the field of biomedical sciences. Until recently, methods for genome editing have been too complicated and practically unavailable for the vast majority of research laboratories. CRISPR-Cas9 technology has started a revolution in the biomedical sciences since it enabled the use of genome engineering methods in almost every research laboratory. This technology has gone a long way from its discovery in bacterial genomes, through being identified as a part of the bacterial immune system, to the application it is most known today – genome engineering. This paper will focus on the practical aspects of using CRISPR-Cas9 and its comparison to similar methods for genome engineering (using TALEN and ZFN nucleases). This paper will cover the benefits and drawbacks of CRISPR-Cas9 genome editing including off-target cleavage, and the possibilities to overcome these drawbacks. The use of CRISPR-Cas9 technology in basic research and clinical studies will be covered in detail. Current research related to CRISPR-Cas9 technology will be covered to emphasize the importance of this method not only for life sciences, but for society as a whole.

**Keywords:** genome engineering, CRISPR -Cas9, gene therapy

## UVOD

Poslednjih nekoliko decenija smo svedoci brzog razvoja molekularne biologije. Sa otkrićem lančane reakcije polimeraze (PCR), metode za umnožavanje i modifikovanje molekula DNK su postale pristupačne gotovo svakoj laboratoriji. Ipak, metode za modifikovanje genoma organizama su do skoro bile relativno komplikovane i neefikasne. Sa primenom CRISPR-Cas9 tehnologije, metode za genomsko inženjerstvo konačno postaju izuzetno pristupačne široj naučnoj zajednici. To je ujedno i razlog zašto se stiče utisak da je revolucija u vezi sa genomskim inženjeringom počela relativno skoro. Međutim, razvoj ovih tehnologija je počeo krajem 1970-tih godina. Kao dokaz koncepta da endogeni lokus u eukariotskoj ćeliji može ciljano da se izmeni homologom rekombinacijom pomoću vektora donora ustanovljeno je 1979. godine u eksperimentima na pekarskom kvacsu (*Saccharomyces cerevisiae*) [1]. Ubrzo je sličan pristup primenjen i na somatskim i embrionalnim ćelijama sisara u kulturi (slika 1) [2–4]. Relativno brzo nakon prvih uspešnih eksperimenata postaje jasno da je efikasnost uvođenja modifikacije u eukariotskim genomima na ovaj način izuzetno mala. Naime, ustanovljeno je da je homologna rekombinacija na ciljanom mestu u genomu u velikoj većini eukariotskih ćelija vrlo redak događaj, a donor vektor se uglavnom integriše na nasumičnom mestu u genomu. Tako je odsustvo homologne rekombinacije kod većine eukariotskih ćelija postala prepreka za masovniju primenu genomskog inženjeringa kako u naučne tako i u kliničke svrhe [5].

## POČECI MODERNOG GENOMSKOG INŽENJERINGA - UVOĐENJE CILJANIH DVOLANČANIH PREKIDA U GENOM

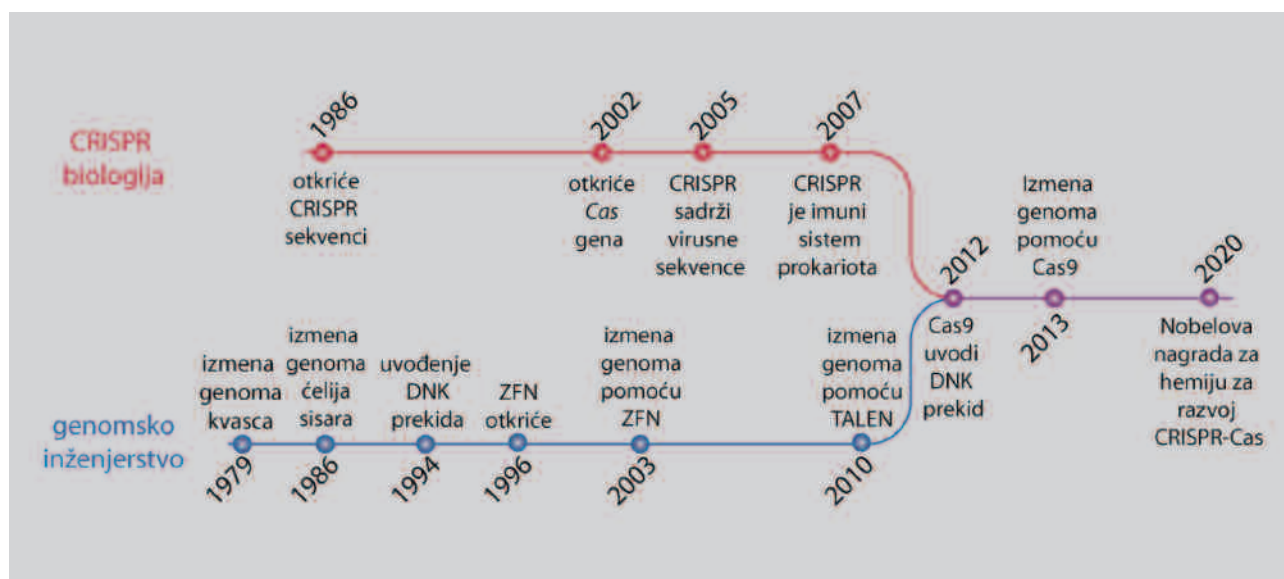
Najveći izazov koji je trebalo da se prevaziđe jeste povećanje učestalosti homologne rekombinacije u somatskim ćelijama. Usled inertnosti endogenog lokusa, do homologne rekombinacije ne dolazi u odsustvu oštećenja DNK. Nakon oštećenja DNK, aktiviraju se mehanizmi popravke uključujući i reparaciju pomoću homologne rekombinacije. Stoga su prvi pristupi povećavanja stope rekombinacije bili bazirani na opštem oštećenju celokupne genomske DNK (uključujući i lokus od interesa) [6]. Ipak, problem kod opšteg oštećenja DNK jeste što sa sobom donosi i neželjene mutacije. Stoga je sledeći pristup bio uvođenje ciljanog dvolančanog prekida pomoću I-SceI (tkzv. „homing“ nukleaze) radi aktiviranja reparacije pomoću homologne rekombinacije [7]. Pristup pomoću „homing“ nukleaze je mnogo efikasniji od tadašnjih alternativa za genomsko inženjerstvo, ali ispostavilo se da nije lako naći odgovarajuće mesto sečenja „homing“ nukleaza, a praktično je nemoguće njihovo „programiranje“ tj. dizajniranje enzima da uvodi dvolančani prekid na tačno ciljanom mestu. Prva klasa enzima koja je mogla da se „programira“, tj. dizajnira da uvede prekid na specifičnoj sekvenci bile su sintetičke nukleaze sa cinkanim prstima (*eng.* zink finger nucleases, ZFN) [8,9]. Pri njihovom dizajnu je iskorišćena mogućnost da se specifični domeni sa cinkanim prstima vezuju za definisane sekvence. Kombinacijom nekoliko različitih domena sa cinkanim prstima postiže se specifično vezivanje za tačno odabranu sekvencu u genomu. Na kraju, dodavanjem FokI endonukleaznog domena za takav niz domena sa cinkanim prstima dobija se mesto-specifična nukleaza. Budući da FokI u formi dimera uvodi dvolančani prekid, neohodno je i za komplementarni lanac dizajnirati fuziju domena sa cinkanim prstima koji će se vezivati za tu sekvencu. Na ovaj način postiže se vrlo specifično uvođenje dvolančanog prekida u željenoj sekvenci. Promenom kombinacije domena sa cinkanim prstima može da se menja mesto tj. sekvenca gde će biti uveden dvolančani prekid [8,9]. Ipak, za veliku većinu naučno-istraživačkih laboratorija dizajniranje specifičnih ZFN je bilo isuviše kompleksno, i ova tehnologija nije naišla na široku primenu u naučnoj zajednici [10]. Problem složenosti specifičnih endonukleaza je delimično rešen sa TALEN nukleazama (*eng.* Transcription activator-like effector nuclease), koje koriste TALE domene koji prepoznaju samo jedan nukleotid, nasuprot domenima kod ZFN koji prepoznaju tri nukleotida [11]. ZFN i TALEN su pokazale da ciljano uvođenje dvolančanog prekida povećava efikasnost modifikovanja genoma. Poređenja radi, svi prethodni pristupi bazirani samo na homolognoj rekombinaciji su imali efikasnost 0.5-2% (sa selekcijom pomoću antibiotika), dok je efikasnost ZFN i TALEN drastično veća (5-30%, sa selekcijom pomoću antibiotika). Ipak, ovi enzimi su izuzetno komplikovani za dizajniranje, a sa druge strane relativno skupi ukoliko se komercijalno naručuju (1000-20000 USD). Upravo zbog te kompleksnosti nikad ZFN i TALEN nisu bile dovoljno pristupačne da bi genomski inženjering postao jedna od standardnih metoda u svim naučno-istraživačkim laboratorijama [10].

## CRISPR-Cas9 SISTEM – OD INTRIGANTNE SEKVENCE SA NEPOZNATOM FUNKCIJOM DO NOBELOVE NAGRADE ZA RAZVOJ METODE ZA MODIFIKOVANJE GENOMA

Paralelno sa razvojem metoda za genomski inženjering, sredinom 2000tih godina se nekoliko laboratorija bavilo proučavanjem CRISPR (*eng.* Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats). Ove sekvence su opisane 1987. godine kao niz kratkih ponovljenih sekvenci između kojih se nalaze isto kratke ali jedinstvene sekvence u genomu bakterije *Escherichia coli* (slika 1) [12]. Kasnije su CRISPR sekvence otkrivene u brojnim bakterijama i arheama [13]. Osim

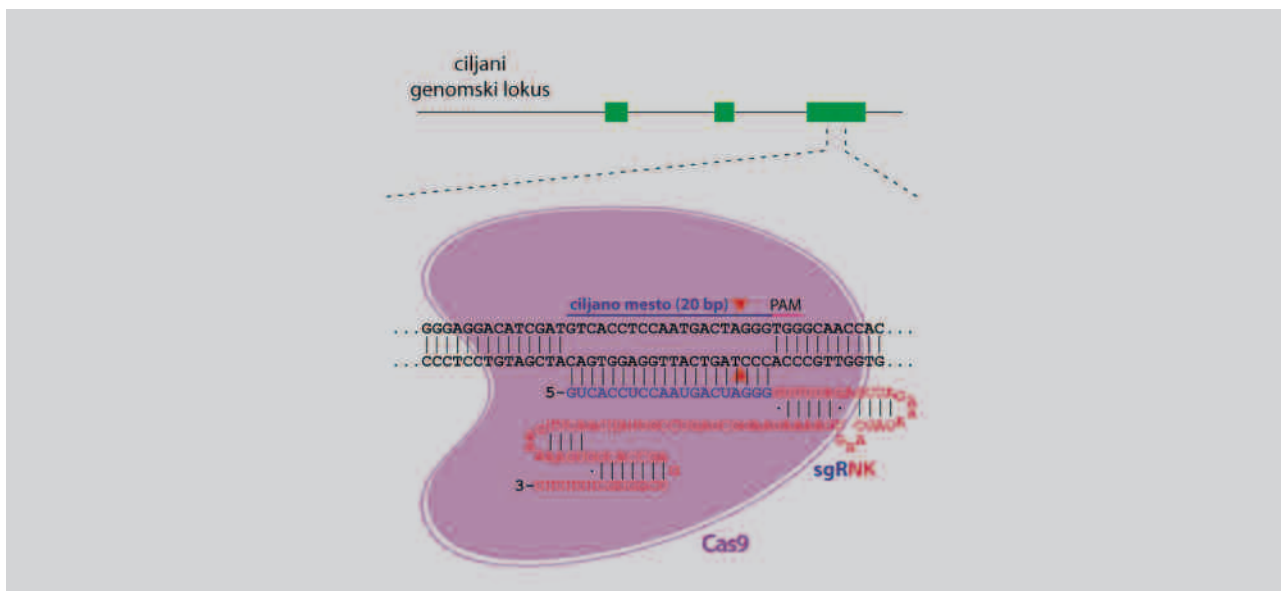


CRISPR sekvenci, identifikovane su i *cas* (*eng.* CRISPR associated) sekvence za koje je bioinformatički utvrđeno da mogu da kodiraju proteine sa nukleaznom i helikaznom aktivnošću [14]. Prve pretpostavke su bile da CRISPR i *cas* genomski regioni imaju ulogu u popravci DNK ili regulaciji ekspresije drugih gena [14]. Do prodora u otkrivanju funkcije CRISPR sekvenci dolazi 2005. godine kada postaje jasno da jedinstvene sekvence u CRISPR regionu potiču od sekvenci virusa bakteriofaga [15]. Ubrzo potom dolazi do otkrića da CRISPR i *cas* sekvence predstavljaju elemente stečenog imunskog sistema bakterija. Naime, eksperimentalno je pokazano da jedinstvene sekvence u okviru CRISPR regiona predstavljaju „memoriju“ na prethodne virusne infekcije i da bakterije ugradnjom virusnih sekvenci u CRISPR region stiču imunitet na dati virus [16]. Sledećih nekoliko godina je fokus bio na pronalaženju molekuskog mehanizma prepoznavanja virusnih sekvenci, njihove obrade, ugradnje u genom, transkripcije i samog mehanizma koji omogućava imunitet na dati virus. Ustanovljeno je da zapravo postoje tri različita tipa molekuskih mehanizama tj. tri različite klase CRISPR-cas sistema: klasa I, klasa II i klasa III [10]. U svim klasama postoje nukleaze koje koriste transkript iz CRISPR regiona da prepoznaju virusne sekvence koje su identične sa jedinstvenim sekvencama CRISPR regiona i uvedu dvolančani prekid u virusne sekvence. U kontekstu uvođenja dvolančanog prekida, zanimljivo je da u CRISPR-Cas klasi II tu ulogu ima samo jedan protein – Cas9 (slika 2) [17,18]. Pokazano je da se za Cas9 nukleazu vezuju dva RNK molekula, crRNK i tracrRNK (CRISPR RNK, *eng.* trans-activating crRNK). Dvolančani prekid se uvodi u sekvenci koja sadrži region dužine od oko 20 nukleotida koji je komplementaran sa crRNK sekvencom i nalazi se odmah uz PAM sekvencu (*eng.* Protospacer Adjacent Motif). PAM sekvenca je različita za Cas9 enzime različitih vrsta, a za najčešće korišćen Cas9 (izolovan iz *Streptococcus pyogenes*) ta sekvenca je NGG, gde je N bilo koji od četiri nukleotida.



**Slika 1. Šematski prikaz razvoja genomske inženjerstva i CRISPR biologije.** Razvoj metoda za genomske inženjerstvo je šematski prikazan na plavoj liniji, dok je razvoj CRISPR biologije prikazan na crvenoj liniji. Ključni događaji su označeni, kao i godina kada su se dogodili. Trenutak spajanja ova dva naučna polja (u ljubičastu liniju na slici) se dogodio 2012. godine kada je pokazano da je Cas9 RNK-vođena DNK endonukleaza. Nedugo zatim je 2013. godine pokazano da Cas9 može da se koristi za modifikovanje genoma.

Nakon opisivanja molekuskog mehanizma delovanja Cas9, vrlo brzo postaje jasno da bi bilo moguće iskoristiti Cas9 za uvođenje specifičnih i ciljanih dvolančanih prekida u genomu eukariotskih ćelija [19–21]. Dodatno, CRISPR-Cas9 sistem je pojednostavljen time što su cr- i tracrRNK spojene u jedan molekul sgRNK (*eng.* single guide RNK) (slika 2). Prve studije su pokazale da CRISPR-Cas9 ima sličnu efikasnost kao ZFN ili TALEN, ali dizajn CRISPR-Cas9 sistema je drastično jednostavniji i pristupačniji [19–21]. Naime, dovoljno je da se uklonira kratka sekvenca od 20 nukleotida u plazmid za ekspresiju gRNK i Cas9 i počne sa genomskim inženjeringom. Poređenja radi, dizajn ZFN ili TALEN nukleaza traje oko 2 meseca, dok je za dizajn gRNK dovoljno par sati. Takođe, molekulske kloniranje plazmida za ZFN ili TALEN traje oko 3 nedelje, dok molekulske kloniranje u slučaju CRISPR-Cas9 tehnologije traje oko 3 dana. I konačno, zbog kompleksnosti su se ZFN i TALEN nukleaze uglavnom naručivale komercijalno dok je CRISPR-Cas9 gotovo svako mogao da dizajnira a hemikalije (tj. oligonukleotidi) koštaju veoma malo (svega 50 USD). Stoga je, u kratkom vremenskom periodu, genomske inženjering pomoću CRISPR-Cas9 tehnologije postao dostupan gotovo svakoj laboratoriji u svetu. Konačno, kao potvrda značaja ove tehnologije za biomedicinske nauke i nauku uopšte, za „razvoj CRISPR-Cas9 metode za uređivanje genoma“ dodeljena je Nobelova nagrada za hemiju 2020. godine. Nobelovu nagradu su dobile Dženifer Dudna (*eng.* Jennifer Doudna) i Emanuel Šarpentje (*fra.* Emmanelle Charpentier), naučnice koje su u svojim bazičnim istraživanjima pokazale da je Cas9 nukleaza vođena pomoću cr- i tracrRNK [17].



**Slika 2. Šematski prikaz Cas9 endonukleaze i sgRNK.** Cas9 endonukleaza iz *Streptococcus pyogenes* (ljubičasto) je prikazana na slici. Ciljano mesto je obeleženo plavom linijom, a odmah uz njega je PAM sekvenca koja je u slučaju *S.pyogenes* Cas9 NGG. Može se primetiti kako je 5' - kraj sgRNK komplementaran sa antiparalelnim lancem ciljanog mesta (plavo obojeni nukleotidi). Oostatak sgRNK (crveno obojeni nukleotidi) ima strukturnu ulogu vezivanja za Cas9. Crvenim trouglovima je obeleženo mesto gde se uvodi dvolančani prekid (blizu PAM mesta).

## PRIMENA CRISPR-Cas TEHNOLOGIJE U BAZIČNIM ISTRAŽIVANJIMA

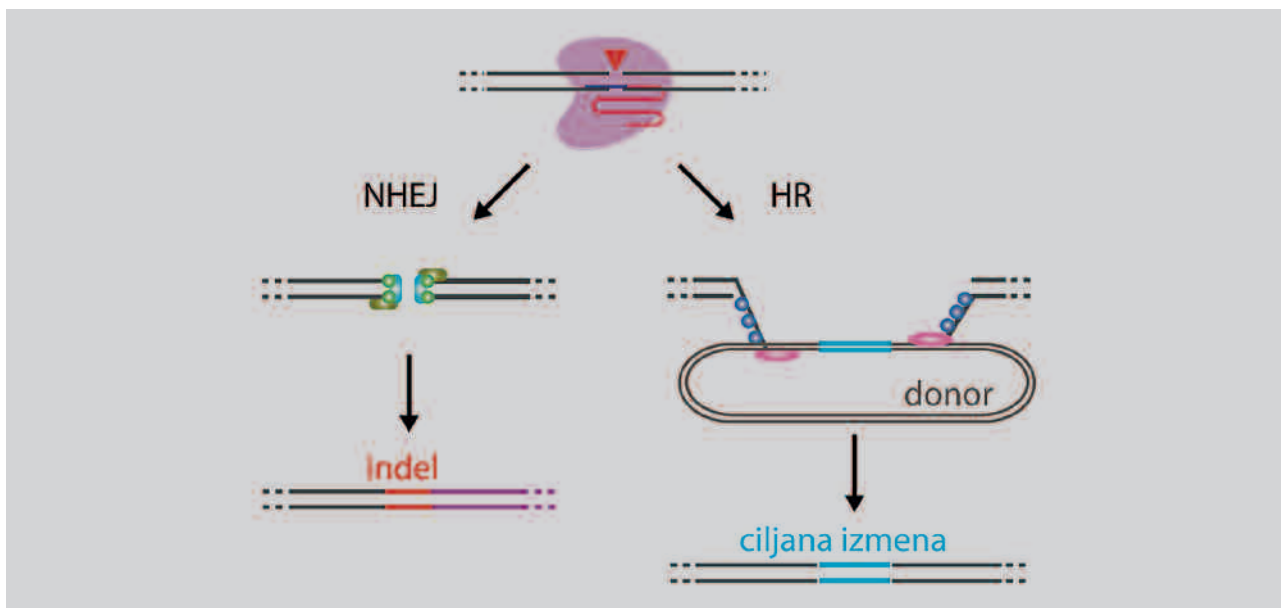
U ovom revijskom radu fokus je na do sada najširoj primeni CRISPR-Cas tehnologije, a to je pravljenje ćelijskih linija sa ciljanim modifikacijama u genomu. CRISPR-Cas tehnologija se u bazičnim istraživanjima najčešće koristi za ispitivanje funkcije proteina kroz modifikaciju gena koji kodira dati protein. Treba istaći da se isti principi koriste i za pravljenje model organizama (npr. miševa, zebrica), a protokoli i vektori su prilagođeni fiziologiji i razviću odgovarajućeg model organizma.

Strategije za genomske modifikacije protein-kodirajućih gena se u suštini dele na dve kategorije – „knockout“ i „knock-in“ pristup (slika 3). Pri „knockout“ pristupu se radi ciljana potpuna inaktivacija gena, dok se pri „knock-in“ pristupu uvodi ciljana i specifična izmena postojećeg gena [5,10,22]. Oba pristupa počinju uvođenjem ciljanog i specifičnog dvolančanog prekida u genom. Uvedeni dvolančani prekid ćelije mogu da „poprave“ na dva načina – nehomolognim spajanjem krajeva (*eng.* non homologous end joining, NHEJ) i reparacijom putem rekombinacije (*eng.* homology directed repair, HDR) (slika 3). Somatske diferencirane ćelije dvolančani prekid najčešće popravljaju nehomolognim spajanjem krajeva [5,10]. Treba imati na umu da je NHEJ reparacioni put sklon „sitnim“ greškama koje podrazumevaju male insercije ili delecije (obično od nekoliko baznih parova). U tehničkom smislu pravljenja genomske modifikacije, NHEJ može da dovede do promene okvira čitanja ukoliko se modifikacija vrši unutar egzona koji su deo otvorenog okvira čitanja. Drugim rečima, dovoljno je samo uvesti dvolančani prekid pomoću CRISPR-Cas9 kako bi se napravila ćelijska linija u kojoj nema ciljanog proteina [23]. Efikasnost pravljenja izmenjenih ćelijskih linija na ovaj način direktno zavisi od dva činioca – efikasnosti transfekcije ćelija i efikasnosti Cas9-sgRNK da uvodi dvolančani prekid. Efikasnost transfekcije je obično poznata za datu ćelijsku liniju i metodu transfekcije, dok efikasnost sečenja Cas9 zavisi od sgRNK. Brojni razlozi utiču na ovu efikasnost, a najčešće se navodi pozicija ciljane sekvence u okviru nukleozoma [19–21]. Preporuka je dizajnirati makar tri različite sgRNK, testirati njihove efikasnosti sečenja i tipično će makar jedna sgRNK imati efikasnost sečenja 5-15% [23].

U „knock-in“ pristupu je cilj da se izmeni ili uvede nova sekvenca u genom (npr. specifična mutacija ili dodatna sekvenca za „tagovanje“ proteina). Tada je potrebno, osim CRISPR-Cas9 vektora zbog dvolančanog prekida, uvesti u ćeliju i vektor donora. Vektor donora sadrži ciljanu sekvencu koja se uvodi u genom, i nizove nukleotida uzvodno i nizvodno od ciljane sekvence koji su komplementarni sa genomskim regionom gde će se uvesti promena. Nakon uvođenja dvolančanog prekida, ćelija može taj prekid da popravi NHEJ ili HDR reparacionim putem. Popravka NHEJ putem ne dovodi do integracije donora u genom. Međutim, ukoliko ćelija popravi dvolančani prekid pomoću HDR, dolazi do rekombinacije sa regionom koji je komplementaran sa oštećenim regionom [5]. U fiziološkom smislu, to je sestrinska hromatida oštećenog regiona, a u kontekstu izmene genoma za HDR može da se iskoristi sekvenca vektora donora i da se praktično integriše donor u genom [10,24,25]. Na taj način se postiže ciljana promena sekvence genoma sa željenom sekvencom. Efikasnost dobijanja knock-in ćelijskih linija zavisi od nekoliko faktora: 1) efikasnosti transfekcije,



2) efikasnosti uvođenja dvolančanog prekida i 3) učestalosti popravke dvolančanog prekida rekombinacijom. Prva dva faktora su ista kao i u knockout pristupu, a učestalost popravke dvolančanog prekida pomoću HDR je ograničavajući faktor u ovom slučaju. Ovaj faktor zavisi od tipa ćelijske linije, ali je relativno mali u diferenciranim somatskim ćelijama. Tipično je učestalost popravke pomoću HDR na odgovarajućem mestu oko 1:100-1:100,000 ćelija [5]. Budući da su ovo relativno retki događaji, vektor donor najčešće sadrži i genetički element koji će omogućiti selekciju. Tipično je to gen za rezistenciju na neki od eukariotskih antibiotika (npr. neomicin ili puromocin) ili npr. gen koji kodira za zeleni fluorescentni protein (GFP) koji omogućava sortiranje ćelija pomoću fluorescencije. I pored selekcije, treba imati na umu da će najveći broj klonskih ćelijskih linija biti linije koje imaju nasumičnu integraciju vektora donora negde u genomu, najčešće ne u ciljanom regionu.



**Slika 3. Modifikovanje genoma pomoću ciljanog dvolančanog prekida u molekulu DNK.** Cas9 (ljubičasto) uvodi dvolančani prekid na ciljanom mestu molekula DNK (dve crne linije). Takav prekid može da se popravi pomoću nehomolognog spajanja krajeva (NHEJ, levo) ili rekombinacionog reparacionog puta (HR, desno). U slučaju popravke pomoću NHEJ, nastaju male insercije ili delecije (indel, crveno) na popravljenom molekulu DNK. Takve insercije ili delecije mogu dovesti do nizvodne promene okvira čitanja (deo molekula DNK označen ljubičasto). U slučaju popravke rekombinacionim reparacionim putem, slobodni krajevi molekula DNK se obrađuju i formiraju tzv. invazivne lance. Takvi invazivni lanci mogu biti spareni sa drugim DNK molekulom sa kojim imaju homologiju. U ovom kontekstu to može da bude vektor donor koji sadrži pored homologne sekvence i ciljanu izmenu koja će biti uvedena u genom (svetlo plavo).

### UVOĐENJE NESPECIFIČNIH DVOLANČANIH PREKIDA

Nijedna od trenutnih metoda za genomsko inženjerstvo zasnovano na uvođenju dvolančanog prekida (ZFN, TALEN, CRISPR) nije savršeno specifična. Za sve pomenute tehnologije je pokazano da se dvolančani prekid, pored ciljanog mesta, uvodi i na drugim (neželjenim, *eng.* off-target) mestima u genomu [5]. U slučaju CRISPR tehnologije, već sa prvim *in vitro* studijama je pokazano da Cas9 nije apsolutno specifičan enzim, i da može da uvede dvolančani prekid i u sekvenci koja je samo delimično komplementarna sekvenci gRNK [17]. Slični rezultati su dobijeni i u eukariotskim ćelijama i model organizmima [26–29]. Sve studije u kojima je ispitivana učestalost uvođenja nespecifičnih dvolančanih prekida su pokazale da ona uglavnom zavisi od dva faktora. Prvi faktor jeste pozicija nekomplementarnih nukleotida na sgRNK. Naime, nespecifični dvolančani prekidi se češće uvode ukoliko se radi o „nepoklapanju“ sekvenci distalno od PAM mesta (5' kraj gRNK). Drugi faktor je sam broj nekomplementarnih baznih parova. Npr. ukoliko se na 5' kraju sgRNK, distalno od PAM mesta, razlikuje jedan nukleotid, efikasnost uvođenja nespecifičnog dvolančanog prekida je uporediva sa učestalošću specifičnog dvolančanog prekida u ciljanj sekvenci. Sa tri i više nukleotida razlike, učestalost uvođenja nespecifičnog dvolančanog prekida dramatično opada [26–28]. Nezavisno od toga kolika je verovatnoća da se uvede nespecifična promena u genomu, potrebno je naglasiti da za sve primene CRISPR-Cas9 tehnologije treba pretpostaviti da ona u ovom trenutku nije jednaka nuli, i u skladu sa tim voditi računa o dizajnu naučno-istraživačke studije, ili kliničkoj primeni ove tehnologije.

U kontekstu naučno istraživačkog rada, potrebno je dokazati da je bilo koji fenotip posledica izmene ciljanog gena, a ne neke mutacije koja je posledica nespecifičnosti Cas9 enzima. Jedan od mogućih pristupa ovom problemu jeste da se svaki fenotip demonstrira u barem dve nezavisne klonске ćelijske linije [23]. Drugi način potvrđivanja specifičnosti fenotipa jeste da se uradi tzv. „rescue“ eksperiment. Pri izvođenju „rescue“ eksperimenta, potrebno je povratiti funkciju

gena od interesa u ćeliji. To se može uraditi egzogeno transfekcijom ili transdukcijom (plazmid ili virus), ili povratkom endogenog gena pomoću CRISPR-Cas9 tehnologije [30,31]. Ukoliko nakon povratka funkcionalnog gena dođe do reverzije pokazanog fenotipa, jasno je da je dati fenotip posledica promene na datom genu od interesa a ne nespecifične promene u genomu. U kontekstu model organizama, moguće je npr. i uvesti promenu u ciljani deo genoma, i onda pomoću nekoliko generacija ukrštanja sa životinjama divljeg soja postići eliminaciju svih neželjenih promena u genomu [5]. Sve ove metode najviše zavise od eksperimentalnih mogućnosti koje su najčešće određene samim model organizmom. Nezavisno od model organizma, za bilo koje naučno istraživanje u kojem se koristi genomski inženjering, potrebno je pokazati da je određena promena posledica ciljane promene a ne nespecifično uvedene mutacije.

Sa druge strane, u kliničkoj praksi važi praktično nulta tolerancija na uvođenje nespecifičnih promena u genom. Ovo je, pored tehničkih poteškoća „dostave“ komponenti CRISPR-Cas sistema u živim organizmima, najveća prepreka za iskorišćenje punog potencijala CRISPR-Cas tehnologije u kliničkoj praksi. Naime, svaka nespecifična mutacija uvedena modifikovanjem genoma u kliničkoj praksi znači da se povećava potencijal za kasnije komplikacije (npr. aktiviranje onkogeno) [32].

Dalja naučna istraživanja, a naročito primena genomskog inženjeringa u kliničkoj praksi, predstavljaju snažne podsticaje za dalje unapređenje CRISPR-Cas tehnologije, naročito u poboljšavanju specifičnosti izmena u genomu. Trenutno se ovakva unapređenja razvijaju u dva relativno nezavisna pravca – usavršavanje bioinformatičkih alata za dizajn sgRNK i usavršavanje eksperimentalnih metoda za genomsko inženjering. U kontekstu bioinformatičkog usavršavanja, prisutan je trend pravljenja sve boljih alata za dizajniranje specifičnih sgRNK koji uzimaju u obzir sve prethodne publikacije o nespecifičnosti Cas9 [33]. Što se tiče samih eksperimentalnih metoda, paralelno se radi na nekoliko različitih pristupa usavršavanja CRISPR-Cas specifičnosti. Jedan od predloga za povećavanje specifičnosti jeste da se zapravo smanji količina Cas9 proteina i sgRNK tj. da se preciznije doziraju [27]. Na ovaj način je pokazano da se povećava specifičnost, ali treba imati na umu da se ipak smanjuje i efikasnost uvođenja ciljanog prekida. Druga mogućnost je uvođenje bliskih jednolančanih prekida pomoću izmenjenog Cas9 (*eng.* nickase Cas9) navođenog pomoću dve različite sgRNK [34]. Pokazano je da se na ovaj način smanjuje uvođenje nespecifičnih mutacija 50 do 1500 puta. Alternativno, postoje pristupi za ciljane izmene Cas9 proteina koje ga čine drastično specifičnijim. Primer je Cas9-HF (*eng.* high fidelity) koji je specifičan do te mere da nije moguće detektovati nespecifične dvolančane prekide [35]. Sva ova potencijalna rešenja nisu međusobno isključiva i verovatno će kombinacija različitih pristupa rezultirati alatima koji su apsolutno specifični.

## KLINIČKA PRIMENA CRISPR-Cas

Primena CRISPR-Cas u kliničkoj praksi je u početnoj fazi, ima izuzetan potencijal, ali je teško predvideti njene domete u budućnosti. Dva najveća izazova na koje treba odgovoriti u ovom trenutku su onemogućavanje uvođenja nespecifičnih promena u genomu i rešenje dostave CRISPR-Cas efektor do specifičnih ćelija u organizmu, što je opšti izazov za sve genetički dizajnirane terapije [36]. Trenutno je aktuelno nekoliko desetina kliničkih ispitivanja u kojima se primenjuje CRISPR-Cas i suštinski se sve kliničke primene u ovom trenutku mogu podeliti u dve velike kategorije: *ex vivo* i *in vivo* [37].

### EX VIVO KLINIČKA PRIMENA CRISPR-Cas TEHNOLOGIJE

Pri *ex vivo* primeni tehnologija za genomski inženjering, ćelije se uzimaju od pacijenta ili donora, zatim se izolovane ćelije modifikuju *in vitro*, i konačno se modifikovane ćelije vraćaju nazad u pacijenta [37]. Najveća prednost *ex vivo* primene CRISPR-Cas tehnologije se ogleda u tome što je tehnički jednostavnije izvršiti genomsku modifikaciju ćelija *in vitro* nego u samom organizmu. Nedostatak *ex vivo* pristupa je to što je ograničen na ćelije koje je moguće izolovati i kasnije vratiti u pacijenta [36,37]. Ovaj pristup se trenutno koristi gotovo isključivo za T limfocite ili hematopoetske matične ćelije. Već sada postoji praksa transplantacije T limfocita ili hematopoetskih stem ćelija iz zdravih donora u pacijenta, ali tek 20% pacijenata nađe odgovarajućeg donora za ovakve procedure [38]. Stoga, pristup genomskom inženjeringu ćelija samog pacijenta ima veliki potencijal jer nije potrebno tražiti odgovarajućeg donora za proceduru transplantacije. Kada je reč o bolestima koje imaju potencijal da se leče na ovaj način, veliki broj ispitivanja je vezan za HIV infekciju, srpastu anemiju,  $\beta$ -talasemiju, kao i za reprogramiranje ćelija imunog sistema zarad efikasnijeg odgovora na ćelije kancera [36]. U kontekstu HIV infekcije, fokus je na genomskim modifikacijama CCR5 gena (koreptora za HIV) u hematopoetskim matičnim ćelijama i CD4+ ćelijama [37]. Postoje indikacije da bi ovaj terapijski pristup mogao biti delimično efikasan, jer je izgleda pored eliminacije CCR5 koreptora potrebno eliminisati još jedan koreceptor virusa – CXCR4. Sličan terapijski pristup je bio dizajniran pomoću ZFN, ali se očekuje da će CRISPR-Cas tehnologija biti uspešnija jer je adekvatnija za istovremene i višestruke izmene u genomu (korišćenjem većeg broja gRNK molekula, ume-

sto celokupnih plazmida za različite ZFN proteine) [39]. Dok je HIV terapija bila u fokusu na početku prvih CRISPR kliničkih ispitivanja, trenutno se najviše radi na direktnim modifikacijama mutacije za srpastu anemiju i  $\beta$ -talasemiju u genomu, a u poslednje vreme je sve više istraživanja vezanih za modifikovanje ćelija imunog sistema radi poboljšanja odgovora na kancer [37]. Sve ove tehnologije za sada pokazuju veliki potencijal i postoje naznake da će opravdati velika očekivanja. Od posebne važnosti je dugoročno praćenje osoba podvrgnutih ovakvim terapijama kako bi se ispitala eventualne nepredvidive i neočekivane komplikacije nastale kao posledica genomske terapije.

## **IN VIVO KLINIČKA PRIMENA CRISPR-Cas TEHNOLOGIJE**

U toku su i kliničke studije sa *in vivo* pristupom genomskom inženjeringu pomoću CRISPR-Cas sistema, mada je njihov broj manji od broja *ex vivo* studija [37]. Najveća prepreka za ovu vrstu primene CRISPR-Cas tehnologije je zapravo ograničenost metoda za dostavu odgovarajućih CRISPR-Cas efektor (plazmida, iRNK ili proteina) do ciljanih ćelija u organizmu. Upravo je ovaj razlog najviše doprineo da se sve kliničke CRISPR-Cas *in vivo* studije rade u tkivima koja su pristupačnija za transfekciju, kao što su oko, jetra i cerviks [36]. Trenutno je najveći broj studija fokusiran na eliminaciju HPV18 i HPV16 onkogeni iz genoma u cerviksu. Paralelno sa CRISPR-Cas tehnologijom, u drugim kliničkim studijama se koriste ZFN i TALEN za iste ili slične modifikacije genoma. Ove studije se prate sa velikom pažnjom jer će moći direktno da se uporede sve tri najzastupljenije tehnologije genomskog inženjerstva [37]. Studija koja je najviše napredovala sa CRISPR primenom *in vivo* jeste pristup za genomsko lečenje transtiretinske amiloidoze [40]. U ovoj bolesti mutacija čini transteritin toksičnim usled pogrešenog konformacionog savijanja. Terapija se zasniva na deleciji mutacije u *TTR* genu pomoću CRISPR efektor - Cas9 iRNK i jedne sgRNK, koji se dostavljaju u hepatocite pomoću lipidnih nanočestica. Prvi rezultati su vrlo ohrabrujući jer su pokazali smanjenje količine mutiranog TTR u krvi i do 87% [40]. Navedene terapije su i dalje eksperimentalnog karaktera, a pacijenti će biti dugoročno praćeni pre nego što CRISPR-Cas terapija postane dostupnija široj populaciji.

Osim genomskog inženjeringa somatskih ćelija, u poslednje vreme se sve više govori o genomskom inženjeringu polnih ćelija, a čak i ljudskih embriona. Štaviše, nekoliko studija je već dokazalo mogućnost modifikovanja genoma ljudskih embriona [41,42]. Ipak, sa velikim iznenađenjem je dočekan vest o rođenju bliznakinja kojima je pomoću CRISPR-Cas9 modifikovan *CCR5* gen u NR Kini. Tom studijom je rukovodio He Jiankui sa Univerziteta za nauku i tehnologiju u Šendženu (NR Kina). Trenutno nije moguće naći nikakve dokaze da su takve tvrdnje tačne, niti bilo kakav naučni rad koji bi izneo podatke da potvrdi takve tvrdnje. U tom smislu, teško je komentarisati takav slučaj jer zapravo gotovo ništa nije poznato od eksperimentalnih podataka. Jedino šta je izvesno u ovom slučaju jeste da nije postojala nikakva etička dozvola za ovakvu vrstu intervencije na ljudskim embrionima. U ovom trenutku prema zvaničnim saznanjima nema nijedne osobe koja je rođena sa modifikovanim genomom. Ipak, ovaj slučaj je podstakao mnoga regulatorna tela da uzmu u razmatranje etičku stranu i opravdanost menjanja genoma ljudi. Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je nedavno izdala savetodavni dokument gde se detaljno razmatra etička strana menjanja ljudskog genoma u različitim slučajevima (npr. postnatalno somatske ćelije, ili polne ćelije) [43].

Još jednom treba istaći da je za budućnost CRISPR-Cas tehnologije i menjanja genoma u terapiji od suštinskog značaja dugoročni ishod brojnih kliničkih studija koje se trenutno izvode. Trenutni rezultati su relativno povoljni, ali treba sagledati potencijalne posledice na osnovu kojih će se proceniti opravdanost korišćenja ove tehnologije [37].

## **DODATNE PRIMENE CRISPR-Cas TEHNOLOGIJE**

Iako je fokus ovog rada na upotrebi CRISPR-Cas tehnologije za uvođenje specifičnog dvolančanog prekida na molekulu DNK, važno je napomenuti i druge primene. Neke eksperimentalne potrebe ne zahtevaju uvođenje DNK prekida, već mogu CRISPR-Cas tehnologiju da iskoriste samo kao platformu za vezivanje za specifičnu DNK sekvencu. U takvoj ulozi se najčešće koristi mutant Cas9 koji nema nukleaznu aktivnost – dCas9 (*eng.* deactivated Cas9) [10]. Kao takav, dCas9 se koristi kao molekul-nosač za koji se vezuju drugi proteini efektori u zavisnosti od potrebe eksperimenta. Tako je npr. moguće koristiti CRISPR-Cas tehnologiju za transkripcionu aktivaciju (fuzijom sa VP64) ili represiju (fuzijom sa KBAB) [44]. Fuzijom GFP-dCas9 može da se obeleži određeni genomski lokus za proučavanje dinamike hromozoma u živim ćelijama. dCas9 je moguće koristiti i u epigenetičkim istraživanjima i to za acetilaciju histona (fuzijom sa p300), DNK metilaciju i demetilaciju (fuzija sa DNMT3a i TET1) [44,45].

Zanimljivo je da CRISPR-Cas tehnologija ima i veliki potencijal za razvoj novih tipova dijagnostičkih testova. Veliki potencijal ove tehnologije se ogleda u brzini razvoja i činjenici da ne zahteva složenu laboratorijsku aparaturu a može čak i da se prilagodi za vizuelnu detekciju (npr. imunohromatografski ili kolorimetrijski). Zbog ovih osobina i trenutne pandemije je veliki fokus na CRISPR-Cas tehnologiji u kontekstu detekcije SARS-CoV-2 [46,47], ali treba napomenuti da je još uvek teško sagledati potencijal ove relativno mlade dijagnostičke tehnologije.

## ZAKLJUČAK

CRISPR-Cas tehnologija je već napravila revoluciju u biomedicinskim naukama i bez sumnje će nastaviti da omogućava brojne prodore u biologiji i medicini u budućnosti. Osim genomskog inženjeringa, CRISPR-Cas tehnologija se može primeniti i za selektivno obeležavanje genoma, modifikovanje epigenoma i u dijagnostičke svrhe. Uz sve potencijalne primene, postaje jasno da će ova tehnologija imati veliki uticaj ne samo na biomedicinske nauke, već i na celokupno društvo. Široka pristupačnost tehnologija za modifikovanje genoma sa sobom donosi velike koristi, ali potrebno je napomenuti da donosi i velike etičke dileme. Sigurno je da će u rešavanju etičkih dilema morati da postoji konzesus kojem u velikoj meri već doprinose naučnici, lekari, ali i ljudi kojima ove tehnologije nisu bliske a imaju ulogu u kreiranju regulative u vezi sa genomskim inženjeringom [43]. Svakako da će konsenzus o upotrebi CRISPR-Cas tehnologije zavisiti dobrim delom i od rezultata kliničkih ispitivanja koja se trenutno sprovode. Sa pažnjom ćemo svi pratiti dugoročne efekte ovih kliničkih ispitivanja jer će uticati na to gde će se postaviti etička granica modifikovanja genoma. A do tada, CRISPR-Cas tehnologija je sigurno postala jedna od osnovnih metoda u molekularnoj biologiji i pratićemo razvoj tehnika koje se na njoj baziraju.

## ZAHVALNICA

Zahvaljujem se Prof. Dr Dušanki Savić-Pavićević, Dr Meliti Vidaković i Dr Snežani Kojić na izuzetno korisnim sugestijama tokom pisanja rada. Autor je član „Returning expert“ programa (Centrum für internationale Migration und Entwicklung, SR Nemačka).

## LITERATURA

1. Scherer S, Davis RW. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;
2. Smithies O, Ronald G, Boggs S, Koralewski M, Kucherlapati R. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal  $\beta$ -globin locus by homologous recombination. *Nature*. 1985;317:230–4.
3. Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*. 1986;44(3):419–28.
4. Thomas K, Capecchi M. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 1987;51:503–12.
5. Carroll D. Genome engineering with targetable nucleases. *Annual Review of Biochemistry*. 2014.
6. Latt SA. Sister chromatid exchange formation. *Annu Rev Genet*. 1981;15:11–55.
7. Rouet P, Smih F, Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol*. 1994;14(12):8096–106.
8. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(3):1156–60.
9. Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science (80- )*. 2003;300(5620):764.
10. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014.
11. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 2010;186(2):756–61.
12. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakamura A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429–33.
13. Mojica F, Díez-Villasenor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria. 2000;36:244–6.
14. Makarova KS, Aravind L, Grishin N V., Rogozin IB, Koonin E V. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(2):482–96.
15. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005;60(2):174–82.
16. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (80- )*. 2007;315(5819):1709–12.
17. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease S figs. *Science (80- )*. 2012;
18. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):2579–86.
19. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (80- )*. 2013;339(6121):823–6.
20. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*. 2013;2013(2).
21. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819–23.
22. Uddin B, Chen NP, Panic M, Schiebel E. Genome editing through large insertion leads to the skipping of targeted exon. *BMC Genomics*. 2015;16(1).
23. Chen N-P, Uddin B, Hardt R, Ding W, Panic M, Lucibello I, et al. Human phosphatase CDC14A regulates actin organization through dephosphorylation of epithelial protein lost in neoplasm. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(20):5201–6.

24. Hilbert M, Noga A, Frey D, Hamel V, Guichard P, Kraatz SHW, et al. SAS-6 engineering reveals interdependence between cartwheel and microtubules in determining centriole architecture. *Nat Cell Biol.* 2016;18(4):393–403.
25. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281–308.
26. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013;
27. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013;
28. Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol.* 2013;
29. Cradick TJ, Fine EJ, Antico CJ, Bao G. CRISPR/Cas9 systems targeting  $\beta$ -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res.* 2013;
30. Jin J, Xu Y, Huo L, Ma L, Scott AW, Pizzi MP, et al. An improved strategy for CRISPR/Cas9 gene knockout and subsequent wildtype and mutant gene rescue. *PLoS One.* 2020;
31. Mazo G, Soplop N, Wang WJ, Uryu K, Tsou MFB. Spatial Control of Primary Ciliogenesis by Subdistal Appendages Alters Sensation-Associated Properties of Cilia. *Dev Cell.* 2016;39(4):424–37.
32. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science (80- ).* 2003;
33. Chuai G hui, Wang QL, Liu Q. In Silico Meets In Vivo: Towards Computational CRISPR-Based sgRNA Design. *Trends in Biotechnology.* 2017.
34. Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity A B C Figure 2. Double Nicking Facilitates Efficient Genome Editing in Human Cells. *Cell.* 2013;
35. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prem MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016;
36. Foss D V., Hochstrasser ML, Wilson RC. Clinical applications of CRISPR-based genome editing and diagnostics. *Transfusion.* 2019;59(4):1389–99.
37. Hirakawa MP, Krishnakumar R, Timlin JA, Carney JP, Butler KS. Gene editing and CRISPR in the clinic: Current and future perspectives. *Biosci Rep.* 2020;40(4).
38. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen Y-S, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and  $\beta$ -Thalassemia. *N Engl J Med.* 2021;384(3):252–60.
39. Yu S, Yao Y, Xiao H, Li J, Liu Q, Yang Y, et al. Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR/Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Hum Gene Ther.* 2018;29(1):51–67.
40. Gillmore JD, Gane E, Taubel J, Kao J, Fontana M, Maitland ML, et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med.* 2021;1–10.
41. Alanis-Lobato G, Zohren J, McCarthy A, Fogarty NME, Kubikova N, Hardman E, et al. Frequent loss of heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(22).
42. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell.* 2015;6(5):363–72.
43. WHO Expert Advisory Committee on Developing Global Standards for Governance and Oversight of Human Genome Editing. *Human genome editing: a framework for governance.* Geneva; 2021.
44. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun.* 2018;9(1).
45. Vojta A, Dobrinic P, Tadic V, Bockor L, Korac P, Julg B, et al. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(12):5615–28.
46. Abudayyeh OO, Gootenberg JS. CRISPR diagnostics. *Science (80- ).* 2021;372(6545):914–5.
47. Xiong E, Jiang L, Tian T, Hu M, Yue H, Huang M, et al. Simultaneous Dual-Gene Diagnosis of SARS-CoV-2 Based on CRISPR/Cas9-Mediated Lateral Flow Assay. *Angew Chemie - Int Ed.* 2021;60(10):5307–15.



## IMPRESUM

### Trendovi u molekularnoj biologiji, 2021.

Izdavač

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
Univerzitet u Beogradu**

Uređivački odbor

Dr **Sonja Pavlović**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Dr **Jelena Begović**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr **Ivana Novaković**, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr **Dužanka Savić Pavićević**, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Ana Đorđević**, naučni savetnik,  
Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja  
„Siniša Stanković“

Recenzenti

Dr **Svetlana Radović**, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Vesna Škodrić Trifunović**, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Gordana Nikčević**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Dizajn i izrada korica

**Ivan Strahinić**

Štampa

**Curent Print**, Beograd

Periodičnost izlaza publikacije

**Godišnje**

Tiraž

**200 primeraka**

### Autori

Anđelković Marina .....	71
Arsić Aleksandra.....	152
Bosnić Dragana .....	180
Djusalov Mila .....	21
Đorić Ilona .....	133
Gadjanski Ivana .....	21
Gašić Vladimir .....	113
Išić Denčić Tijana .....	96
Janjušević Ljiljana .....	21
Janković Miljuš Jelena .....	133
Janković Radmila .....	96
Jovčić Branko .....	166
Keckarević Dušan .....	54
Keckarević Marković Milica .....	54
Kecmanović Miljana .....	54
Knežić Teodora .....	21
Kojadinović Milica .....	152
Kokanov Nikola .....	123
Komazec Jovana .....	84
Kosijer Petar .....	21
Kotur Nikola .....	6
Kožik Bojana .....	123
Krajnović Milena .....	123
Malešević Milka .....	166
Nikolić Dragana .....	180
Panić Marko .....	33
Perić Stojan .....	60
Pešović Jovan .....	60
Popović D. Željko .....	21
Radenković Lana .....	60
Rakićević Ljiljana .....	146
Rakočević-Stojanović Vidosava .....	60
Ristić Nina .....	96
Samardžić Jelena .....	180
Savić-Pavićević Dužanka .....	60
Šelemetjev Sonja .....	133
Skakić Anita .....	42
Spasovski Vesna .....	107
Stanković Biljana .....	6
Stojiljković Maja .....	42
Tošić Nataša .....	113
Ugrin Milena .....	84
Vreća Miša .....	107
Zukić Branka .....	6



CIP - Каталогизacija y publikaciji  
Народна библиотека Србије, Београд

577.2

**TRENDOVI u molekularnoj biologiji** = Trends in  
Molecular Biology. - 2021, br. 1 (sep.)- . - Beograd :  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
2021- (Beograd : Curent Print). - 28 cm

Godišnje. - Tekst na srp. i engl. jeziku.  
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji  
COBISS.SR-ID 45105929