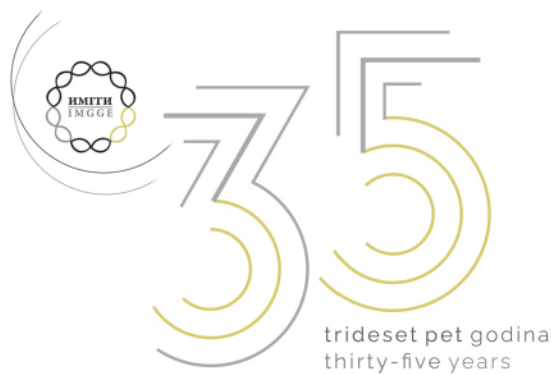


Broj 1 • septembar 2021. N° 1 • September 2021.



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 RECENZIJA 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 KOVID-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**

## Primena CRISPR/Cas9 tehnologije u otkrivanju novih molekularnih terapeutika

Anita Skakić, Maja Stojiljković

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

Kontakt: maja.stojiljkovic@imgge.bg.ac.rs

### Apstrakt

CRISPR/Cas9 (eng. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9*) je prirodni alat za editovanje genoma usvojen iz prokariotskog adaptivnog imunskog odbrambenog sistema. Zbog svoje visoke efikasnosti i preciznosti, protein Cas9 koji pripada CRISPR sistemu klase II, pronašao je primenu u mnogim poljima nauke. Editovanje genoma zasnovano na tehnologiji CRISPR/Cas9 predstavlja jedan od najperspektivnijih alata za lečenje humanih bolesti sa genetičkom osnovom, uključujući kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne poremećaje i različite vrste tumora. Genska terapija zasnovana na CRISPR/Cas9 opsežno se proučava u prekliničkim i kliničkim studijama. Editovanje genoma CRISPR/Cas9 je takođe robustan alat za stvaranje *in vitro* ćelijskih i životinjskih model sistema za istraživanje i lečenje genetičkih bolesti, posebno bolesti povezanih sa tačkastim promenama. U ovom radu, osvrnućemo se kratko na istoriju i mehanizam sistema CRISPR/Cas9, različite metodološke pristupe, napraviti pregled primena u biomedicini i opisati njegovu ulogu u razvoju novih molekularnih terapeutika za retke nasledne bolesti.

**Ključne reči:** CRISPR/Cas9, editovanje genoma, genska terapija, *in vitro* i životinjski model sistemi, retke bolesti, molekularni terapeutici

## Application of CRISPR/Cas9 technology in the discovery of new molecular therapeutics

Anita Skakic, Maja Stojiljkovic

Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade

Correspondence: maja.stojiljkovic@imgge.bg.ac.rs

### Abstract

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9 (CRISPR/Cas9) is a naturally occurring genome editing tool adopted from the prokaryotic adaptive immune defense system. Due to its high efficiency and precision, the Cas9 protein derived from the type II CRISPR system, has found applications in many fields of science. Currently, CRISPR/Cas9-based genome editing has become one of the most promising tools for treating human genetic diseases, including cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders, and various types of tumors. CRISPR/Cas9-based gene therapy is extensively studied in preclinic and clinic treatments. CRISPR/Cas9 genome editing is also a robust tool to create *in vitro* cellular and animal model systems for investigating and treating human genetic disorders, particularly diseases associated with point mutations. Therefore, in this review, we will present a brief history and mechanism of the CRISPR/Cas9 system. We will also describe the different methodological approaches, review applications in biomedicine and describe its role in the development of new molecular therapeutics for rare inherited diseases.

**Key words:** CRISPR/Cas9, genome editing, gene therapy, *in vitro* and animal model systems, rare diseases, molecular therapeutics

## 1. UVOD

CRISPR/Cas9 (eng. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9*) tehnologija predstavlja revolucionarnu metodu koja je privukla pažnju naučnika širom sveta iz razloga što omogućava precizno editovanje genoma različitih tipova ćelija i organizama. CRISPR/Cas9 je u literaturi opisana kao RNK molekulom posredovana adaptivna odbrana imunskog sistema bakterija i arheja od invazije virusa i plazmida (1). Ovaj sistem prvobitno je otkriven 1980. godine u *Escherichia coli* (2), ali njegova funkcija nije potvrđena sve do 2007. godine kada je pokazano da *Streptococcus thermophilus* može steći otpornost na bakteriofag integracijom infektivnog genetičkog fragmenta u svoj CRISPR lokus (3). Od tada, ovaj novootkriveni sistem ubrzo je modifikovan kako bi se koristio kao alat za editovanje željenih regiona u različitim genomima (4).

Otkako je prepoznata 2012. godine (1, 5), tehnologija editovanja genoma CRISPR/Cas9 brzo je razvijena i primenjena u mnogim biološkim i biomedicinskim poljima. Naročito je u poslednjih 5 godina ova tehnologija značajno modifikovana i poboljšana u različite osnovne i primenjene istraživačke svrhe, uključujući biotehnoološku primenu u poljoprivredi i medicini. Na osnovu svojih karakteristika i potencijala za editovanje željenih regiona gena, formiranje novih model sistema kako za funkcionalne studije, tako i za testiranje novih molekularnih terapeutika, CRISPR/Cas9 privukao je veliku pažnju u lečenju mnogih bolesti sa genetičkom osnovom. Stoga se čini da je tehnologija CRISPR/Cas9 napravila revoluciju u molekularnoj biologiji i medicini. Kao potvrda značaja ovog otkrića, godine 2020. Emanuel Šar-pentije i Dženifer Dudna dobile su Nobelovu nagradu za hemiju za otkriće CRISPR/Cas genetskih makaza, jednog od najmoćnijih alata za editovanje genoma.

Zbog svoje preciznosti i pojednostavljenog editovanja genoma, CRISPR/Cas se takođe koristi za razvoj genske terapije sa ogromnim potencijalom, koja uključuje editovanje, regulaciju i praćenje pojedinačnih gena na genomskom i epigenomskom nivou (6). Stoga, u ovom radu osvrnućemo se na mehanizam delovanja i različite metodološke pristupe, napraviti pregled primena u medicini i opisati njenu ulogu u razvoju novih molekularnih terapeutika za retke nasledne bolesti.

## 2. KLASIFIKACIJA SISTEMA CRISPR/Cas

CRISPR/Cas predstavlja bakterijski adaptivni imuni sistem koji koristi RNK molekulom vođenu nukleazu za odstranjivanje stranog genetičkog materijala uvođenjem dvolančanih prekida u DNK ili RNK molekul (7-9). Do sada su identifikovane dve glavne klase CRISPR/Cas sistema koji ukupno sadrže šest tipova i 33 podtipova (4). Ukupna klasifikacija i njihove opšte karakteristike sumirane su u Tabeli 1.

Klasa	Tip	Efektorski kompleksi	Nukleazni domen	Targetna sekvenca
I	I	Više Cas proteina u zavisnosti od tipa i podtipa – Cas3 (nekad fuzionisan sa Cas2), Cas5-Cas8, Cas10, Cas11	HD <sup>1</sup> fuzionisan sa Cas3	DNK
	III		HD fuzionisan sa Cas10	
	IV		Nepoznat	
II	II	Cas9	RuvC i HNH <sup>2</sup>	RNK
	V		RuvC i Nuc <sup>3</sup>	
	VI		HEPN <sup>4</sup>	

<sup>1</sup>HD – Histidin-aspartat domen, <sup>2</sup>HNH – HisAsn-His nukleazni domen, <sup>3</sup>Nuc – nukleazni domen u Cpf1,

<sup>4</sup>HEPN – Higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domains

Tabela 1. Pregled CRISPR/Cas klasifikacije i opšte karakteristike

Do sada su identifikovane dve glavne klase CRISPR/Cas sistema u širokom spektru bakterijskih i arhejskih domaćina koje se karakterišu različitim arhitekturama efektorskih kompleksa koji čine jedinstveni Cas proteini (4). To ilustruje spektar biohemijskih primena koje oni obavljaju u različitim koracima imuniteta posredovanog ovim sistemom, ali samo su neki od njih prilagođeni kao istraživački alati (4, 10). Sistemi klase I koriste multisubjedinčni kompleks proteina Cas, dok se sistemi klase II oslanjaju na Cas-protein sa jednim efektorskim kompleksom. Iako čine oko 90% otkrivenih sistema CRISPR/Cas, vrlo je malo primera sistema klase I koji su namenjeni za editovanje genoma sisara (11-13).



Najbolje opisan i najviše izučavan je CRISPR sistem tip II (1, 5, 14) koji se sastoji od nukleaze Cas9, crRNK (CRISPR-RNK) niza koji kodira mali vodič RNK molekul (eng. *single-guide RNA*, sgRNK) i neophodne pomoćne transaktivirajuće crRNK (eng. *trans activated crRNA*, tracrRNK) koja olakšava procesovanje crRNK lanca i omogućava povezivanje crRNK i Cas9 u ribonukleoproteinski kompleks (5, 14). Svaka crRNK jedinica sastoji se iz 20 nt dugačke *guide* sekvence i parcijalno direktnih ponovaka (koji se nazivaju protospejseri), koji navode Cas9 na 20 bp dugačku target sekvencu DNK i spajaju se sa njom po principu komplementarnosti. Vezivanje endonukleaze Cas9 sa željenim genomskim lokusom posredovano je i kratkom sekvencom od 3 bp u targetnoj DNK sekvenci. Taj niz naziva se protospejser susedni motiv ili region PAM (eng. *Protospacer Adjacent Motif*, PAM). Neophodno je da motiv PAM bude smešten odmah nishodno od mesta komplementarnosti, u suprotnom Cas9 se neće vezati ni uvesti dvolančane prekide. U CRISPR/Cas9 sistemu koji potice od *S. pyogenes*, targetnom DNK lokusu mora da prethodi motiv PAM 5'-NGG ili 5'-NAG (1), dok drugi Cas9 ortolozi mogu zahtevati drugačije motive PAM kao kod *S. termophilus* (5'-NNAGAA za CRISPR1 i 5'-NGGNG za CRISPR3) i *Neisseria meningitidis* (5'-NNNGATT) (5, 14).

### 3. STRATEGIJE

Tehnologija editovanja genoma zasnovana na CRISPR/Cas9 sistemima poslednjih 10 godina reprogramirana je da cilja određene regione eukariotskog genoma i postala je moćno oruđe za genetski inženjering (1, 5). Istraženi su mnogi pristupi kako bi se poboljšala aktivnost editovanja genoma upotrebom ove tehnologije i mnoge strategije su razvijene i primenjene u brojnim studijama. Među njima, *knockout* i *knockin* gena, editovanje baze i *prime* editovanje pokazale su se neverovatno obećavajuće u genskoj terapiji. Štaviše, ove strategije primenjene su za editovanje genoma u pretkliničkim istraživanjima i kliničkim ispitivanjima.

#### 3.1. *Knockout* i *knockin* gena

Metoda editovanja genoma zasniva se na upotrebi endonukleaza koje su vođene malim dizajniranim sgRNK molekulom koji se komplementarno vezuje za željeni DNK lokus i time omogućava endonukleazi da na specifičnom mestu u genomu uvede dvolančani prekid (eng. *Double Strand Break*, DSB) ~ 3-4 bp ushodno od regiona PAM (1, 15). Nakon uvedenog prekida, targetovani lokus biva podvrgnut reparaciji DNK uz pomoć dva glavna mehanizma:

- nehomologim sparivanjem krajeva (eng. *Non-Homologous End Joining*, NHEJ),
- reparacijom homologom rekombinacijom (eng. *Homology Directed Repair*, HDR)(16).

U odsustvu reparacione matrice, dvolančani prekid popravlja se procesom NHEJ koji ostavlja ožiljke u formi malih insercija/delecija (eng. *indels*). NHEJ se može iskoristiti za konstruisanje *knockout* gena, pošto male insercije/delecije u okviru kodirajućeg regiona gena dovode do promena koje menjaju okvir čitanja (eng. *frameshift variants*) i pojave pre vremena stop kodona (eng. *nonsense variants*) (17).

HDR je alternativni put reparacije DNK. Iako se dešava znatno ređe i varijabilnije frekvencije nego NHEJ, ovaj proces može biti korišćen za generisanje precizno definisanih modifikacija targetovanih lokusa uz prisustvo egzogeno uvedene matrice za reparaciju (konstruisanje *knockin* gena). Reparaciona matrica može biti u formi dvolančanog DNK konstrukta ili jednolančanog DNK oligonukleotida (ssODN, eng. *Single-Stranded Donor Oligonucleotide*) (18). Upotrebom ove strategije, moguće je izvršiti inserciju novog gena na željenu lokaciju u genomu, kao ispravljanje nesinonimnih varijanti u targetovanom genomskom lokusu. Ipak, efikasnost ovog procesa je znatno niža od NHEJ, iz razloga što je HDR aktivna samo u ćelijama koje se dele, a efikasnost zavisi od tipa i stanja ćelije, kao i od genomskog lokusa i reparacione matrice (18).

#### 3.2. Editovanje baze

Nesumnjivo je da je ova metoda stekla značajnu popularnost poslednjih godina i prepoznata je kao moćno sredstvo moderne medicine. Međutim, uprkos mnogim prednostima, ovaj alat sklon je greškama, što može dovesti do uvođenja neželjenih promena u genomu (*off-targeta*). Editovanje baze (eng. *base editing*, BE) predstavlja vrstu editovanja genoma koja obezbeđuje direktnu, nepovratnu konverziju jednog baznog para u drugi na ciljnom genomskom lokusu bez potrebe za uvođenjem dvolančanih prekida, reparacione matrice i procesa HDR (19).

Princip editovanja genoma zasnovanog na tehnologiji CRISPR/Cas9 bazira se na postojanju dva funkcionalna domena Cas9, jedan je HNH, a drugi RuvC, gde svaki domen preseca jedan lanac ciljane sekvence DNK formirajući dvolančani prekid (20, 21). Ako se jedan ili oba funkcionalna domena deaktiviraju promenom njihovih aminokiselina ili modifikacijom strukture, to ne utiče na njihovu aktivnost vezivanja za DNK. Prema ovom principu, naučnici su modifikovali Cas endonukleazu da bi izmenili domene HNH i/ili RuvC i samim tim formirali deaktiviran protein Cas9 (dCas9) i Cas9 nikazu (eng. *Cas9 nickase*, nCas9) za različite svrhe editovanja genoma. Što je još važnije, svi proteini Cas, dCas ili nCas mogu se fuzionisati sa različitim molekulima, uključujući drugi enzim, bez uticaja na njihovu funkciju veziva-

nja i uvođenja prekida. Koristeći ova saznanja, grupa David R. Liu na Univerzitetu Harvard prvi put je razvila tehnologiju CRISPR/Cas editovanja baze za promenu određene baze na željenom mestu u genomu fuzijom enzima za modifikovanje baze sa nCas9 endonukleazom (22). U svojoj studiji fuzionisali su enzim citidin deaminazu (eng. *Cytidine deaminase*, CDA) sa nCas9 da bi napravili editor baze citozina (eng. *Cytosine Base Editor*, CBE), koji može da izvrši zamenu citidina (C) u uridin (U), a zatim u procesu translacije se on prevodi u timin (T) i putem ovog načina uspešno su dobili editovanje baze C>T ili G>A (22). Kasnije su takođe razvili sistem editovanja koji menja A>T bazni par u G>C bazni par fuzijom enzima adenin deaminaze (eng. *Adenine deaminase*, ADA) sa nCas9, koga su nazvali adeninski bazni editor (eng. *Adenine Base Editor*, ABE) (19). Trenutno su ABE i CBE dve klase CRISPR/Cas DNK editora baze, koji mogu izvršiti zamenu sve četiri nukleotidne promene (C>T, A>G, T>C i G>A). Nedavno je nekoliko laboratorija razvilo editor dvostrukie deaminaze koji kombinuje ABE i CBE, sa ciljem da se istovremeno indukuje editovanje baze adenina i citozina. (23).

### 3.3. Editovanje RNK

Pored editovanja DNK, sistem CRISPR/Cas9 mogu da edtuju i RNK. CRISPR/Cas13 sistem (klasa II, tip VI) sadrži protein Cas13 sa ribonukleaznom aktivnošću, koji se može vezati za ciljanu jednolančanu RNK (eng. *single stranded RNA*, ssRNK) i uvoditi prekide (24). Do danas su identifikovana četiri proteina Cas13: Cas13a (poznat i kao C2c2), Cas13b, Cas13c i Cas13d (25). Uspešno su primenjeni u degradaciji RNK, obeležavanju transkripata, regulaciji obrade primarnog transkripta i detekciji virusa (26-28). Kasnije, razvijena su dva sistema za izmenu baze u RNK, (*Repair* sistem, omogućava zamenu A>G; *Rescue* sistem, omogućava zamenu C>T) spajanjem katalitički inaktiviranog Cas13 (dCas13) sa domenom adenin/citidin deaminaze ADAR2 (adenozin deaminaza koja deluje na RNK tip 2) (29, 30).

### 3.4. Prime editovanje

Osnovno editovanje (eng. *Prime Editing*, PE) predstavlja najnoviju primenu tehnologije CRISPR/Cas, koju je 2019. godine razvila grupa Liu sa Univerziteta Harvard (31). Ovaj metod editovanja uveo je dve velike promene u tradicionalni sistem CRISPR/Cas9: fuziju reverzne transkriptaze sa nCas9 i *prime* vodič RNK (eng. *Prime editing guide RNA*, pegRNK) umesto tradicionalne sgRNA. U pegRNK, osim sgRNK koja sadrži i tracrRNK i graničnik (eng. *spacer*), nalazi se i gen-specifična sekvenca RNK koja sadrži vezivno mesto prajmera (eng. *Primer Binding Site*, PBS) koje je komplementarno sa željenim regionom za editovanje. Takođe, pored regiona PBS nalazi se i deo sekvence sa varijantom koja se uvodi u genom (31). U ovom novom pristupu sgRNK navodi sistem CRISPR/Cas9 da prepozna i locira DNK vezujući region. Nakon što nCas9 preseče suprotni lanac DNK i formira jednolančani prekid DNK, mesto prekinutog lanca DNK služi kao mesto za vezivanje PBS sekvence iz pegRNK. Uz pomoć fuzionisane reverzne transkriptaze, vrši se sinteza novog fragmenta DNK koji za cilj ima da zameni željeni region u genomu. Dakle, *prime* editovanje može da zameni određenu sekvencu DNK bez egzogeno uvedene matrice (31). Za razliku od tradicionalnog CRISPR/Cas9 sistema i editovanja baze, *prime* editovanje može da zameni bilo koji nukleotid upotrebom jednog sistema sa sniženom verovatnoćom pojave *off-targeta*. Takođe, može poboljšati efikasnost i tačnost ovog sistema, a samim tim i značajno proširiti opseg editovanja genoma u biološkim i terapijskim istraživanjima. U teoriji moguće je ispraviti do 89% poznatih varijanti u genima koji izazivaju različite bolesti (31). Ipak, kao nova tehnika editovanja genoma, potrebno je još istraživanja kako bi se bolje razumeo i poboljšao ovaj sistem.

## 4. PRIMENE CRISPR/Cas9 SISTEMA U ISTRAŽIVANJU HUMANIH OBOLJENJA

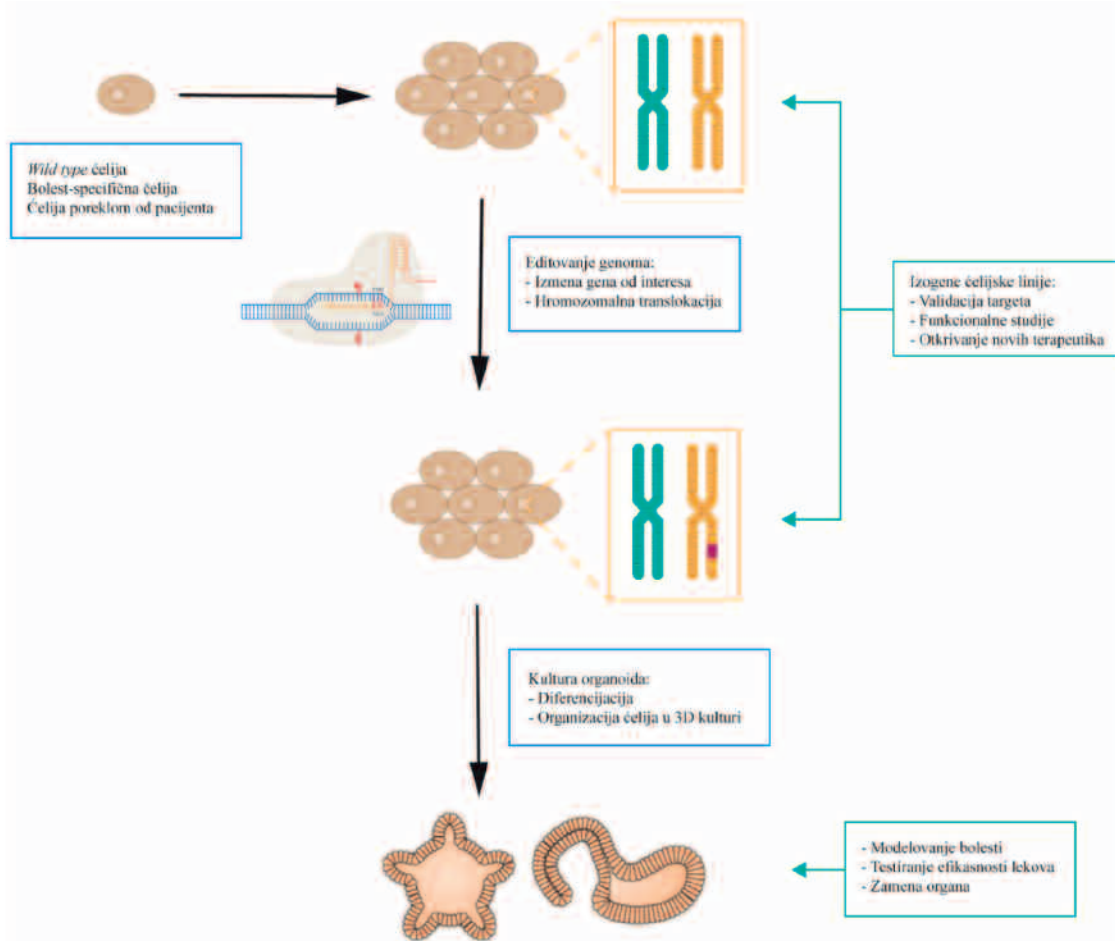
### 4.1. CRISPR/Cas9 sistem za uspostavljanje *in vitro* ćelijskih model sistema

Napredak metoda za sekvenciranje DNK na velikoj skali i njihova široka upotreba, proširio je razumevanje povezanosti prisustva genetičkih varijanti sa predispozicijom razvoja određenih bolesti i odgovora na specifičnu terapiju. Takav napredak podstakao je interesovanje za „personalizovanu“ ili „preciznu“ medicinu, koja kombinuje kliničke i biohemijske informacije o pacijentu sa ličnim genetičkim podacima kako bi direktno informisala pojedinca o individualnoj strategiji lečenja. Međutim, hipoteze generisane naporima opservacionih „omika“ često zahtevaju testiranje na preciznim genetskim modelima, posebno za određivanje patogenog efekta varijanti nepoznatog značaja (eng. *variants of uncertain significance*, VUS), optimizaciju stratifikacije pacijenta, preusmeravanje upotrebe odobrenih lekova na nove patologije i razvijanje alternativnih načina lečenja.

Iako postoje jasne indikacije za razvoj određene bolesti, često postoje mnoge zbunjujuće karakteristike koje zasklanjaju direktnu vezu određenog genotipa sa fenotipom bolesti. Trenutno se istraživači često oslanjaju na odgovarajuće uzorke pacijenata iz bolesnog i zdravog tkiva kako bi se utvrdila njihova povezanost. Međutim, kolekcije ovakvih uzoraka u mnogim slučajevima nisu dostupne. Pojava tehnologije CRISPR/Cas9 drastično je promenila ovaj pristup (Slika 1). Stvaranje izogenih *knockout* humanih i životinjskih ćelijskih linija za uporednu genomiku sada je tako jedno-



stavno da je za samo 4 godine ova praksa postala uobičajena (32), a sprovede je istraživači širom sveta. Utvrđeno je da je efikasnost editovanja genoma posredstvom CRISPR/Cas9 veća *in vitro* nego *in vivo*, pa upotreba genetski modifikovanih ćelijskih modela može u velikoj meri skratiti vreme u biomedicinskim istraživanjima. Do sada su istraživači koristili CRISPR/Cas9 sisteme za izvođenje genetskih manipulacija na različitim tipovima ćelijskih linija, kao što su tumorske ćelije, primarne i matične ćelije, kako bi simulirali fenotip raznih ljudskih bolesti (33).



**Slika 1. Primena tehnologije CRISPR/Cas9 u generisanju ćelijskih modela.** CRISPR/Cas9 editovanje genoma može se koristiti za generisanje izogenih ćelijskih linija za testiranje patogenog efekta uvedenih varijanti u gen od interesa, funkcionalne studije kao i za validaciju targeta molekularnih terapeutika. Izogene ćelijske linije takođe se mogu koristiti za stvaranje organoida, koji su posebno korisni za modeliranje procesa diferencijacije i samoorganizacije, kao i za testiranje efikasnosti novih terapeutika.

*Knockout* gena putem CRISPR/Cas9 pokazao se efikasnim u praktično svim tipovima ćelija, uključujući indukovane pluripotentne matične ćelije (eng. *induced pluripotent stem cells*, iPSCs), organoide specifične za određeni tip tumora i primarne imunske ćelije (34-36). *Knockout* pristup našao je svoju primenu i u otkrivanju senzitivnosti tumorskog tkiva na terapijski pristup koji podrazumeva uvođenje dvolančanih prekida u targetovane gene tumorskih ćelija (37-39). Na ovaj način formirane izogene *knockout* tumorske ćelijske linije omogućavaju istraživačima da utvrde uzročne uloge onkogeno, tumor supresora i drugih faktora u tumorogenezi.

Slično tome, upotrebom pristupa *knockin* za ubacivanje željenih promena pomoću aktivacije HDR, omogućeno je testiranje efekta genetičkih varijanti povezanih sa razvojem različitih bolesti. Na primer, HDR može poslužiti za generisanje ćelijskih linija sa prisustvom varijanti u različitim genima za upoređivanje efekata svake promene detektovane kod pacijenata, kao što je to slučaj za onkogene *KRAS*, *PIK3CA* i *IDH1*, ili tumor supresore uključujući *TP53*, *RB1* i *VHL* (40). Uopšteno, ovako editovane ćelijske linije mogu se koristiti za analizu efekta varijanti na razvoj bolesti ili za ispitivanje novih molekularnih terapeutika. U studiji Skakić i sar. po prvi put u Srbiji je upotrebljena tehnologije CRISPR/Cas9 i pristup *knockin*, i to za uvođenje nove, neokarakterisane humane varijante c.248G>A (41) u gen *SLC37A4* humane embrionalne bubrežne ćelijske linije 293F1pIn T-Rex (HEK293F1pIn) i formiran je novi *in vitro* model sistem za funkcionalnu karakterizaciju ove varijante i ispitivanje uloge ove promene u patogenezi glikogenoze tip Ib (GSD tip Ib) (42). Novi *in*

*vitro* GSD tip Ib model sistem je u okviru iste studije upotrebljen za analizu apoptoze i stresa endoplazmatičnog retikuluma (37), a u budućnosti će imati primenu u testiranju molekularnih terapeutika dizajniranih da koriguju metaboličke abnormalnosti povezane sa disfunkcijom bubrega kod osoba obolelih od GSD tip Ib.

Pored toga, iPSCs su pokazale veliku mogućnost primene u uspostavljanju modela bolesti, otkrivanju lekova i razvoju ćelijske terapije specifične za pacijenta (43). iPSCs imaju sposobnost samoobnavljanja i potencijal višestruke diferencijacije, što je od velikog značaja u uspostavljanju modela bolesti i u istraživanjima regenerativne medicine (44). Poslednjih godina, kombinovanjem sistema CRISPR/Cas sa iPSCs tehnologijom, istraživači su kreirali mnogobrojne nove i pouzdane *in vitro* model sisteme bolesti i pružili nova rešenja za supstitucionu terapiju ćelija i preciznu terapiju kod raznih ljudskih bolesti, uključujući neurodegenerativne bolesti,  $\beta$ -talasemiju, sindrom stečene imunodeficijencije (AIDS), itd. (43-45).

#### 4.2. CRISPR/Cas9 sistem za konstruisanje životinjskih model sistema

Pored primene ove tehnologije za editovane genoma različitih ćelijskih kultura, CRISPR/Cas9 dramatično je promenilo našu sposobnost konstruisanja životinjskih model sistema. Jedna od glavnih primena i prednosti tehnologije CRISPR/Cas9 za editovanje genoma je konstruisanje životinjskih model sistema za proučavanje i lečenje humanih genetičkih oboljenja.

Da bi se dobile životinje koje će ispoljavati određeni fenotip bez mozaičnog potomstva, vrši se editovanje matičnih ćelija samog embriona (eng. *embryonic stem cell*, *ESC editing*), koji se ubrzo nakon izmene genoma implementira u matericu ženke (23). Efikasno editovanje upotrebom CRISPR/Cas9, uključujući NHEJ ili HDR, može se postići takođe i mikroinjekcijom ili jednostavnom elektroporacijom zigota umesto manipulacijom matičnih ćelija embriona (46, 47). Ovakav pristup pruža nekoliko prednosti. Prvo, s obzirom da se u jednom koraku može izmeniti više gena, dvostruko i trostruko varijantni miševi mogu se brzo generisati bez potrebe za ukrštanjem jednovarijantnih sojeva. Drugo, editovanje zigota eliminiše zahtev za izolacijom, gajenjem i editovanjem ESC-a, što je predstavljalo glavnu prepreku za praćenje genetske varijabilnosti kod nekoliko model organizama relevantnih za proces otkrića novih terapeutika, poput pacova. Editovanje zigota takođe ubrzava stvaranje dodatnih varijanti u već postojećim životinjskim modelima za određene bolesti, eliminišući potrebu za ukrštanjem jednovarijantnih sojeva (48).

Primena CRISPR/Cas9 na veliki broj organizama obećava, jer je tradicionalno targetovanje gena i dalje teško u pretkliničkim modelima, osim kod miševa. Editovanje genoma upotrebom ove tehnologije izvedeno je kod pacova (27, 49), pasa (50) i majmuna (51), vrsta koje se najčešće koriste tokom pretkliničkih studija razvoja terapeutika. Sve u svemu, CRISPR/Cas9 je revolucionarni metod za editovanje genoma animalnih modela koji je smanjio vreme potrebno za generisanje targetovanih modela sa nekoliko godina na par meseci ili nedelja. U eri otkrivanja novih terapeutika, veliki spektar životinjskih model sistema je moguće kreirati u vremenskom okviru koji je relevantan za rane odluke o investiranju resursa za razvijanje i testiranje novih lekova.

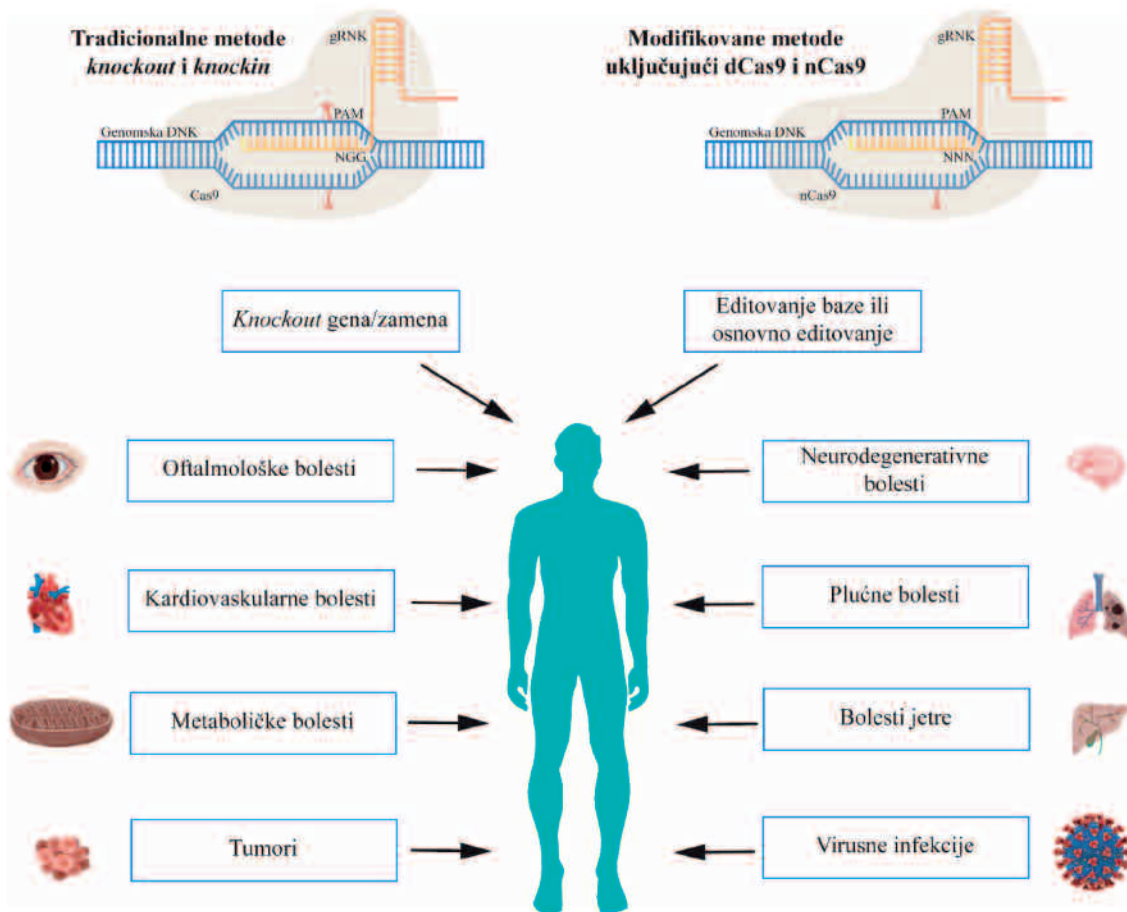
#### 4.3. Upotreba CRISPR/Cas sistema u genskoj terapiji

Genska terapija se odnosi na uvođenje stranih gena u ciljne ćelije za lečenje specifičnih bolesti sa genetskom osnovom (52). S obzirom da je genska terapija germinativnih ćelija komplikovana i uključuje etička i bezbednosna pitanja, danas je genska terapija ograničena na gensku terapiju somatskih ćelija (53). Tradicionalna genska terapija obično se sprovodi homologom rekombinacijom ili upotrebom lentivirusnih vektora. Ipak, efikasnost homologe rekombinacije je niska, a lentivirusni vektori se nasumično integrišu u genom domaćina, što u kliničkim okvirima predstavlja potencijalni bezbednosni rizik (54). Trenutno, sa brzim razvojem CRISPR/Cas9 sistema, on se široko primenjuje u genskoj terapiji za lečenje određenih retkih bolesti sa monogenskom osnovom, infektivnih bolesti, različitih tipova tumora, a svoj potencijal pokazuje i u lečenju neurodegenerativnih, kardiovaskularnih bolesti, itd (Slika 2) (53, 54). Određene terapije za editovanje genoma posredovane CRISPR/Cas9 sistemom već su dostigle fazu kliničkog ispitivanja (55).

##### 4.3.1. Retke bolesti

Retke bolesti su heterogena grupa bolesti čija se kategorizacija zasniva na niskoj prevalenci. Sve bolesti čija je prevalenca niža od 5:10 000 se ubrajaju u retke bolesti. Trenutno je u literaturi opisano blizu 7000 različitih retkih bolesti (56). Sa razvojem medicine i molekularne genetike, neprekidno se opisuju nove retke bolesti. Prema podacima Internacionalnog konzorcijuma za istraživanje retkih bolesti, IRDiRC, u poslednjih deset godina opisano je blizu 900 novih retkih bolesti (57). Za retke bolesti je zajedničko i to što su po pravilu teške, hronične i neizlečive bolesti koje pogađaju mlade (čak 50% se razvija u dečijem uzrastu).

Iako su retke bolesti pojedinačno retke, osobe obolele od retkih bolesti su brojne. Smatra se da je 6-8% svetske populacije obolelo, što bi značilo da čak 330 miliona ljudi u svetu boluje od neke retke bolesti (56). U Srbiji ne postoji



Slika 2. Potencijal editovanja genoma upotrebom različitih pristupa tehnologije CRISPR/Cas9 u lečenju humanih genetskih bolesti.

registar za obolele od retkih bolesti, ali se na osnovu navedene svetske statistike, broj obolelih od retkih bolesti u Srbiji može proceniti na blizu 500 000.

Kod preko 80% retkih bolesti identifikovana je genetička osnova, dok se kod oko 20% retkih bolesti osnova može naći u virusnim i bakterijskim infekcijama, alergijama ili uticaju životne sredine. Retke bolesti sa genetičkom osnovom mogu biti monogenske, multifaktorijalne (dečije leukemije) ili hromozomske aberacije (Turnerov sindrom, Edvarsov sindrom itd).

Monogenske bolesti su genetičke bolesti uslovljene prisustvom varijanti u samo jednom genu. Sve monogenske bolesti se prema svojoj prevalenci mogu svrstati u retke, i do sada je registrovano više od 6600 humanih monogenskih bolesti (58).

Za retke bolesti za koje postoji jasan klinički simptom, kao što je to slučaj sa hiperfenilalaninijom u krvi i telesnim tečnostima koja je prepoznatljiv znak bolesti fenilketonurija, sniženim nivoom MCV i MCH parametara u krvnoj slici koji ukazuju na beta talasemiju ili povišenim nivoom 17-hidroksiprogesterona što je simptom karakterističan za kongenitalnu adrenalnu hiperplaziju, do genetičke potvrde se stiže testiranjem jednog gena (59-61). Međutim, zbog kompleksne kliničke slike većine retkih bolesti, tek je sekvenciranje nove generacije pojednostavilo i ubrzalo dijagnostiku omogućavajući da se veći broj gena, koji bi mogli da budu odgovorni za razvoj simptoma bolesti, istovremeno analiziraju (41, 62).

Napredak u razvoju lekova za retke bolesti (orfan lekova) na žalost ne prati adekvatnim tempom napretke koji su postignuti u dijagnostici (63). Trenutno za čak 90% monogenskih bolesti ne postoji specifičan efikasan tretman. Ova činjenica ukazuje na ogromnu potrebu za novim istraživanjima i otkrićima adekvatnih terapijskih opcija za obolele od monogenskih bolesti.

U današnje vreme, mnogi životinjski modeli monogenskih bolesti tretirani su genskom terapijom posredovanom CRISPR-om. Dalje, u toku su čak i klinička ispitivanja za neke monogenske bolesti bazirana na genskoj terapiji upotrebom tehnologije za editovanje genoma CRISPR/Cas9 (Tabela 2) (55).

ID kliničke studije	Bolest	Gen	Faza kliničke studije	Tretman	Uzrast	Država
NCT03745287	Bolest srpastih ćelija	<i>BCL11A</i>	I/II	CTX001	12-35	SAD, Belgija, Nemačka, Kanada i Italija
NCT03728322	Talasemija	<i>HBB</i>	I	iHSCs	2-60	/
NCT03855631	Kabuki sindrom 1	<i>MLL4</i>	završena	Intervencija na primarnim ćelijama poreklom od pacijenta	6+	Francuska
NCT03872479	Leber congenital amaurosis (LCA)	<i>CEP290</i>	I/II	AGN-151587	3+	SAD
NCT04122742	Rubinstein- Taybi sindrom	<i>CREBBP</i>	I	Izmena varijanti u genu <i>CREBBP</i>	10+	Francuska

Tabela 2. Pregled kliničkih ispitivanja genske terapije upotrebom tehnologije za editovanje genoma CRISPR/Cas9

#### 4.4. CRISPR/Cas9 sistem za kreiranje novih terapijskih pristupa i lekova

Pored stvaranja moćnih istraživačkih alata, editovanje genoma upotrebom različitih pristupa tehnologije CRISPR/Cas9, takođe pruža nadu za kreiranje potpuno novih terapeutika. Brzo i jeftino reprogramiranje enzima Cas9 daje mu jasnu prednost u odnosu na druge metode editovanja (poput ZFNs i TALEN) kada se iskaže potreba za izmenom mnogo različitih genskih lokusa.

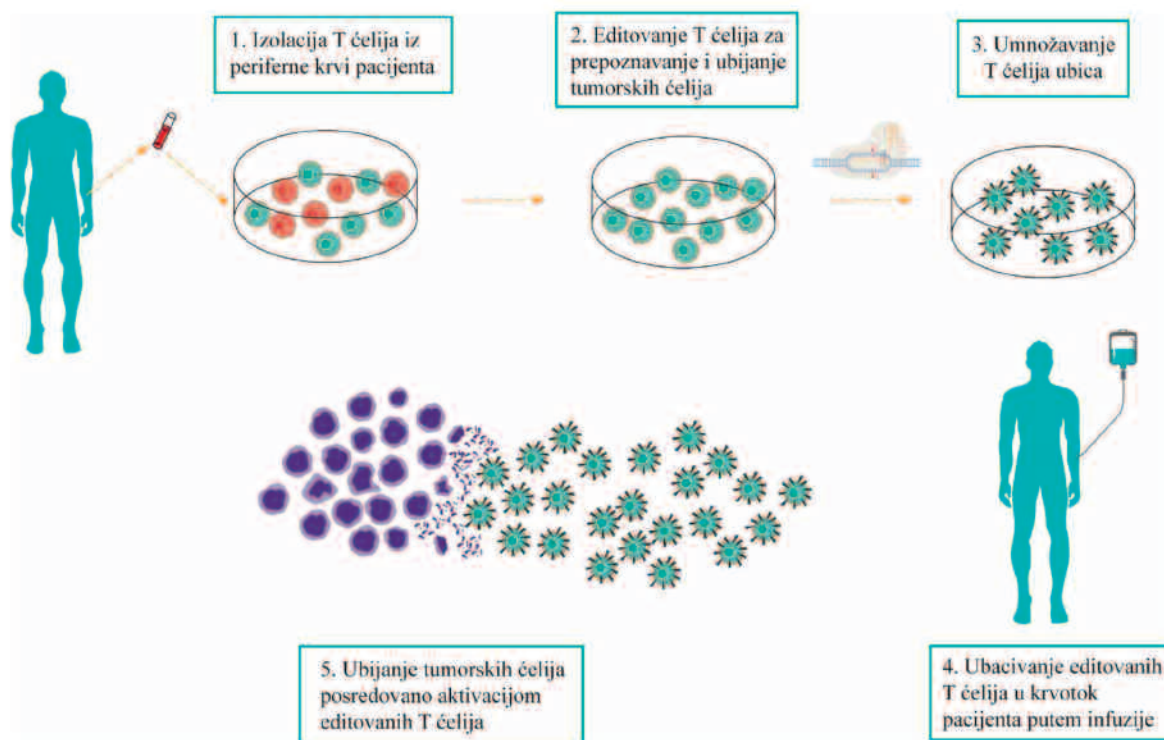
Primena editovanja gena za somatske bolesti počela je da se preklapa sa eksplozivnim poljem imunoterapije tumora, sa interesom usredsređenim na proizvodnju himernih antigen T-ćelijskih receptora (eng. *chimeric antigen receptor T cells*, CAR-Ts) nove generacije. Ove modifikovane T ćelije, koje ekspiriraju receptore specifične za tumorske ćelije, pokazale su potencijal u lečenju različitih leukemija i limfoma, a mogu se koristiti i za lečenje solidnih tumora (64). Receptori CAR sadrže ekstracelularni vezujući domen, koji prepoznaje antigen koji je snažno ekspiriran na tumorskoj ćeliji, i intracelularni himerni signalni domen koji prilikom angažovanja receptora, aktivira T ćelije i promovise ubijanje tumorskih ćelija posredovano T-ćelijama. Prva ovakva terapija CAR-T ciljala je CD19, antigen koji se ekspirira na B limfocitima i srodnim ćelijama karcinoma. (65).

Trenutno se većina CAR-T ćelija generiše pomoću sopstvenih T ćelija svakog pacijenta, što je skup i dugotrajan proces koji uključuje izolovanje, modifikovanje i umnožavanje T ćelija za svakog novog pacijenta. CAR-T terapija bi mogla da postane mnogo brža i jeftinija ako se generiše univerzalni davalac CAR-Ts, jer takve ćelije bi znatno povećale broj obolelih koji bi mogli da se leče jednim proizvodom. Međutim, odbacivanje transplantiranih ćelija, prouzrokovano prepoznavanjem ćelija primalaca od strane CAR-T ćelija i prepoznavanje CAR-T ćelija od strane domaćina, i dalje ostaju glavne prepreke. U tom kontekstu, tehnologija CRISPR/Cas9 bi mogla biti iskorišćena za formiranje *knockout* endogenih TCR gena u T ćelijama, što bi moglo sprečiti neželjeno odbacivanje CAR-T ćelija (Slika 3). Strategije za editovanje genoma mogu se takođe koristiti za sprečavanje ili odlaganje odbacivanja CAR-T ćelija od strane imunog sistema primaoca uklañanjem ili smanjenjem ekspresije histokompatibilnih antigena na donorskim T ćelijama (66). Do danas, nekoliko kliničkih ispitivanja je u toku koja podrazumevaju upotrebu tehnologije CRISPR/Cas9 za *knockout* receptora PD1 endogenih T ćelija i u CAR-T ćelijama koje targetiraju melanom, tumor pluća, prostate i bešike, kao i karcinom bubrežnih ćelija (67-70).

## 5. ZAKLJUČAK

Intenzivan razvoj sistema CRISPR/Cas9 je doveo do značajnih rezultata u savremenoj nauci zato što na jednostavan i visoko efikasan način omogućava transkripcionu regulaciju, genomske modifikacije i epigenetičko editovanje. Sistem CRISPR/Cas9 uspešno se koristi za editovanje genoma širokog spektra vrsta, poput miševa, pacova, pasa, majmuna i ljudi. Tehnologija CRISPR/Cas9 kao moćno sredstvo za editovanje genoma primenjena je u mnogim oblastima, od ba-





**Slika 3.** Kratak pregled terapijskog pristupa u formiranju CAR-T terapije upotrebom tehnologije CRISPR/Cas9

zičnih naučnih istraživanja, personalizovanog pristupa u lečenju humanih bolesti do terapije tumora. Mnogobrojna istraživanja o upotrebi ovog sistema u lečenju različitih humanih bolesti sa genetičkom osnovom su u toku.

## ZAHVALNICA.

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-9/2021-14/200042.

## LITERATURA

- 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(6096):816-21.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429-33.
- 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(5819):1709-12.
- Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(2):67-83.
- 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):E2579-86.
- Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun*. 2018;9(1):1911.
- Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010;327(5962):167-70.
- Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*. 2011;45:273-97.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(6):467-77.
- Koonin EV, Makarova KS. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2019;374(1772):20180087.
- Cameron P, Coons MM, Klompe SE, Lied AM, Smith SC, Vidal B, et al. Harnessing type I CRISPR-Cas systems for genome engineering in human cells. *Nature Biotechnology*. 2019;37(12):1471-7.

12. Dolan AE, Hou Z, Xiao Y, Gramelspacher MJ, Heo J, Howden SE, et al. Introducing a Spectrum of Long-Range Genomic Deletions in Human Embryonic Stem Cells Using Type I CRISPR-Cas. *Mol Cell*. 2019;74(5):936-50.e5.
13. Morisaka H, Yoshimi K, Okuzaki Y, Gee P, Kunihiro Y, Sonpho E, et al. CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells. *Nat Commun*. 2019;10(1):5302.
14. Garneau JE, Dupuis M, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010;468(7320):67-71.
15. Hsu PD, Zhang F. Dissecting neural function using targeted genome engineering technologies. *ACS Chem Neurosci*. 2012;3(8):603-10.
16. 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.
17. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):636-46.
18. Chen F, Pruett-Miller SM, Huang Y, Gjoka M, Duda K, Taunton J, et al. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat Methods*. 2011;8(9):753-5.
19. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, et al. Programmable base editing of A-T to G-C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017;551(7681):464-71.
20. Jiang F, Taylor DW, Chen JS, Kornfeld JE, Zhou K, Thompson AJ, et al. Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science*. 2016;351(6275):867-71.
21. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935-49.
22. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 2016;533(7603):420-4.
23. Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet*. 2018;19(12):770-88.
24. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belanto JJ, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*. 2017;550(7675):280-4.
25. O'Connell MR. Molecular Mechanisms of RNA Targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR-Cas Systems. *J Mol Biol*. 2019;431(1):66-87.
26. Ali Z, Mahas A, Mahfouz M. CRISPR/Cas13 as a Tool for RNA Interference. *Trends Plant Sci*. 2018;23(5):374-8.
27. Yang LZ, Wang Y, Li SQ, Yao RW, Luan PF, Wu H, et al. Dynamic Imaging of RNA in Living Cells by CRISPR-Cas13 Systems. *Mol Cell*. 2019;76(6):981-97.e7.
28. Granados-Riveron JT, Aquino-Jarquín G. CRISPR-Cas13 Precision Transcriptome Engineering in Cancer. *Cancer Res*. 2018;78(15):4107-13.
29. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*. 2017;358(6366):1019-27.
30. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Franklin B, Koob J, Kellner MJ, Ladha A, et al. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science*. 2019;365(6451):382-6.
31. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 2019;576(7785):149-57.
32. 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.
33. Zarei A, Razban V, Hosseini SE, Tabei SMB. Creating cell and animal models of human disease by genome editing using CRISPR/Cas9. *J Gene Med*. 2019;21(4):e3082.
34. Grobarczyk B, Franco B, Hanon K, Malgrange B. Generation of Isogenic Human iPSC Cell Line Precisely Corrected by Genome Editing Using the CRISPR/Cas9 System. *Stem Cell Rev Rep*. 2015;11(5):774-87.
35. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med*. 2015;21(3):256-62.
36. Drost J, van Jaarsveld RH, Ponsioen B, Zimmerlin C, van Boxtel R, Buijs A, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature*. 2015;521(7550):43-7.
37. Shi J, Wang E, Milazzo JP, Wang Z, Kinney JB, Vakoc CR. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. *Nat Biotechnol*. 2015;33(6):661-7.
38. Kasap C, Elemento O, Kapoor TM. DrugTargetSeqR: a genomics- and CRISPR-Cas9-based method to analyze drug targets. *Nat Chem Biol*. 2014;10(8):626-8.
39. Smurnyy Y, Cai M, Wu H, McWhinnie E, Tallarico JA, Yang Y, et al. DNA sequencing and CRISPR-Cas9 gene editing for target validation in mammalian cells. *Nat Chem Biol*. 2014;10(8):623-5.
40. Chen J, Ye Y, Sun H, Shi G. Association between KRAS codon 13 mutations and clinical response to anti-EGFR treatment in patients with metastatic colorectal cancer: results from a meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;71(1):265-72.
41. Skakic A, Djordjevic M, Sarajlija A, Klaassen K, Tosic N, Kecman B, et al. Genetic characterization of GSD Ib in Serbian population revealed unexpectedly high incidence of GSD Ib and 3 novel SLC37A4 variants. *Clin Genet*. 2018;93(2):350-5.
42. Skakic A, Andjelkovic M, Tosic N, Klaassen K, Djordjevic M, Pavlovic S, et al. CRISPR/Cas9 genome editing of SLC37A4 gene elucidates the role of molecular markers of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal involvement in glycogen storage disease type Ib. *Gene*. 2019;703:17-25.
43. Hotta A, Yamanaka S. From Genomics to Gene Therapy: Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing. *Annu Rev Genet*. 2015;49:47-70.
44. Kim HS, Bernitz JM, Lee DF, Lemischka IR. Genomic editing tools to model human diseases with isogenic pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2014;23(22):2673-86.
45. Chang CY, Ting HC, Su HL, Jeng JR. Combining Induced Pluripotent Stem Cells and Genome Editing Technologies for Clinical Applications. *Cell Transplant*. 2018;27(3):379-92.
46. Chen S, Lee B, Lee AY, Modzelewski AJ, He L. Highly Efficient Mouse Genome Editing by CRISPR Ribonucleoprotein Electroporation of Zygotes. *J Biol Chem*. 2016;291(28):14457-67.
47. Wang W, Kutny PM, Byers SL, Longstaff CJ, DaCosta MJ, Pang C, et al. Delivery of Cas9 Protein into Mouse Zygotes through a Series of Electroporation Dramatically Increases the Efficiency of Model Creation. *J Genet Genomics*. 2016;43(5):319-27.
48. Beard C, Hochedlinger K, Plath K, Wutz A, Jaenisch R. Efficient method to generate single-copy transgenic mice by site-specific integration in embryonic stem cells. *Genesis*. 2006;44(1):23-8.



49. Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* 2013;31(8):681-3.
50. Zou Q, Wang X, Liu Y, Ouyang Z, Long H, Wei S, et al. Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system. *J Mol Cell Biol.* 2015;7(6):580-3.
51. Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell.* 2014;156(4):836-43.
52. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature.* 2015;526(7573):351-60.
53. Steffin DHM, Hsieh EM, Rouse RH. Gene Therapy: Current Applications and Future Possibilities. *Adv Pediatr.* 2019;66:37-54.
54. Sahel DK, Mittal A, Chitkara D. CRISPR/Cas System for Genome Editing: Progress and Prospects as a Therapeutic Tool. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019;370(3):725-35.
55. Xu Y, Li Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020;18:2401-15.
56. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet.* 2020;28(2):165-73.
57. Boycott KM, Hartley T, Biesecker LG, Gibbs RA, Innes AM, Riess O, et al. A Diagnosis for All Rare Genetic Diseases: The Horizon and the Next Frontiers. *Cell.* 2019;177(1):32-7.
58. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM® Baltimore, MD: McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University; 2021 [updated 30. July 2021. Available from: <http://omim.org/>.
59. Stojiljkovic M, Jovanovic J, Djordjevic M, Grkovic S, Cvorkov Drazic M, Petrucev B, et al. Molecular and phenotypic characteristics of patients with phenylketonuria in Serbia and Montenegro. *Clin Genet.* 2006;70(2):151-5.
60. Radmilovic M, Zukic B, Stankovic B, Karan-Djurasevic T, Stojiljkovic M, Spasovski V, et al. Thalassemia syndromes in Serbia: an update. *Hemoglobin.* 2010;34(5):477-85.
61. Milacic I, Barac M, Milenkovic T, Ugrin M, Klaassen K, Skakic A, et al. Molecular genetic study of congenital adrenal hyperplasia in Serbia: novel p.Leu129Pro and p.Ser165Pro CYP21A2 gene mutations. *J Endocrinol Invest.* 2015;38(11):1199-210.
62. Stojiljkovic M, Klaassen K, Djordjevic M, Sarajlija A, Brasil S, Kecman B, et al. Molecular and phenotypic characteristics of seven novel mutations causing branched-chain organic acidurias. *Clin Genet.* 2016;90(3):252-7.
63. Hechtelt Jonker A, Hivert V, Gabaldo M, Batista L, O'Connor D, Aartsma-Rus A, et al. Boosting delivery of rare disease therapies: the IRDiRC Orphan Drug Development Guidebook. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(8):495-6.
64. Torikai H, Reik A, Liu PQ, Zhou Y, Zhang L, Maiti S, et al. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood.* 2012;119(24):5697-705.
65. Fellmann C, Gowen BG, Lin PC, Doudna JA, Corn JE. Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(2):89-100.
66. Torikai H, Reik A, Soldner F, Warren EH, Yuen C, Zhou Y, et al. Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors. *Blood.* 2013;122(8):1341-9.
67. Cyranoski D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. *Nature.* 2016;535(7613):476-7.
68. Kalos M, June CH. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity.* 2013;39(1):49-60.
69. Lloyd A, Vickery ON, Laugel B. Beyond the antigen receptor: editing the genome of T-cells for cancer adoptive cellular therapies. *Front Immunol.* 2013;4:221.
70. Hoos A. Development of immuno-oncology drugs - from CTLA4 to PD1 to the next generations. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(4):235-47.



**BIOMEDICINA**  
RETKE BOLESTI

**BIOMEDICINE**  
RARE DISEASES



## 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  
Nародна 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