

Broj 2 • septembar 2022. N° 2 • September 2022.



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



Beograd • Belgrade • 2022.
IMGGI • IMGGE

Pedesetogodišnjica osnivanja studijskog programa molekularna biologija i fiziologija Gordana Matić	8	50th anniversary of the molecular biology and physiology study program
TRPV1: Ciljno mesto dejstva lekova u terapiji različitih stanja Branislava Medić Brkić, Katarina Savić Vujović, Dragana Srebro, Sonja Vučković	15	TRPV1: A Promising drug target for the treatment of various conditions
Geni-modifikatori β -talasemijskih sindroma – novi terapijski pristupi Milena Ugrin	32	Gene modifiers in β -thalassemia syndromes – a new therapy approach
Novi uvid u genetiku naslednih perifernih neuropatija Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dusan Keckarević	51	Genetics of inherited peripheral neuropathies: renewed data
Savremeni pristupi u istraživanju molekularne osnove karcinoma prostate Zorana Dobrijević, Suzana Matijašević-Joković, Ana Branković, Ana Djordjević, Milica Popović i Goran Brajušković	63	Modern approaches in research of the molecular basis of prostate cancer
Uticaj tumorske mikrosredine na razvoj i progresiju maligniteta Ilona Đorić, Tijana Išić Denčić, Sonja Šelemetjev	75	The effects of tumor microenvironment on malignancy formation and progression
Uloga hsa-miR-93-5p u kolorektalnom karcinomu Jovana Despotović	90	Role of hsa-miR-93-5p in colorectal cancer Jovana Despotović
Antitumorski potencijal novih derivata steroidnih hidrazona Marijana B. Živković	104	Antitumor potential of new steroidal hydrazone derivatives
Molekularna dijagnostika glioblastoma – klinički uticaji <i>IDH</i> mutacija i epigenetičkog utišavanja aktivnosti <i>MGMT</i> gena Nikola Jovanović, Tatjana Mitrović	125	Molecular diagnostics of glioblastoma – clinical impact of <i>IDH</i> mutations and epigenetic silencing of <i>MGMT</i>
Molekularni profil timoma Jelena Perić	143	Molecular profile of thymoma
Ekspresija i funkcija insulina u centralnom nervnom sistemu Tamara Dakić, Predrag Vujović	155	Insulin expression and action in the central nervous system
Neuroprotektivni potencijal progesterona Ivana Guševac Stojanović, Dunja Drakulić	168	Neuroprotective progesterone potential
Uloga dehidroepiandrosterona u moždanoj ishemiji/reperfuziji Marina Zarić Kontić, Jelena Martinović	186	Effect of dehydroepiandrosterone on cerebral ischemia/reperfusion
Hemijski profil i antioksidativna aktivnost crvenih vina klonova autohtone i internacionalnih sorti vinove loze Neda Đorđević	206	Chemical profile and antioxidative activity of red wines obtained from autochthonous and international grape clone varieties
Dihidrohalkoni jabuke florizin i floretin kao nove alelopatske supstance Mariana Stanišić, Slavica Ninković, Nevena Banjac	223	Apple dihydrochalcones phloridzin and phloretin as novel allelochemicals
Dosadašnja postignuća na promeni boje cvetova biljaka metaboličkom modulacijom biosinteze karotenoida Milena Trajković, Sladjana Jevremović, Aleksandar Cingel	238	Recent advances in flower color alteration by metabolic manipulation of carotenoid biosynthesis
Bioinformatički alati za analizu mikroRNK Katarina Zeljić	255	Bioinformatics tools for the analysis of microRNA
Marker porekla kao adut u forenzičkim analizama DNK u kompleksnim slučajevima iz perspektive Y hromozoma Miljana Kecmanović, Milica Keckarević Marković, Dušan Keckarević	275	Lineage marker as a key player in complex forensic cases from the perspective of Y chromosome

Predgovor

Uspostaviti tradiciju je mnogo teže nego realizovati inicijativu. Pokazalo se da je prvi broj tematskog zbornika **Trendovi u molekularnoj biologiji 1** pobudio interesovanje naučne zajednice u Srbiji, tako da drugi broj nije bilo teško sastaviti. Broj poglavlja u tematskom zborniku **Trendovi u molekularnoj biologiji 2** je premašio očekivanja. Kao da je Tematski zbornik simbolično postao - Ko je ko u molekularnoj biologiji u Srbiji. I ponovo se pokazalo da se naučnici u našoj zemlji bave aktuelnim istraživačkim temama i aktivno doprinose napretku molekularne biologije na mnogim poljima. I mladi molekularni biolozi su prikazom svojih doktorskih teza pokazali da prate svetske trendove i savremene naučne pristupe.

Posebnost ovog broja je što se objavljuje u vreme kada obeležavamo jubilej, pedesetogodišnjicu Beogradske škole molekularne biologije, o čemu svedoči tekst u kome je prikazan put razvoja programa za molekularnu biologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Pre više godina na jednom naučnom skupu se govorilo o tome kako saznanja iz molekularne biologije prožimaju sve naučne oblasti koje se bave živim organizmima i kako se može predvideti da će njena primena obeležiti novi vek. Iz auditorijuma je stigao komentar: „Proći će i vaše“. Vreme svedoči da je era molekularne biologije tek počela.

„I šta ćemo sad?“

Sonja Pavlović

Iz recenzija Tematskog zbornika ***Trendovi u molekularnoj biologiji***

Drugi broj tematskog zbornika „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ predstavlja nastavak prikazivanja i objavljivanja najznačajnijih naučnih radova proisteklih iz doktorskih disertacija mladih naučnika Srbije, kao i najznačajnijih naučnih rezultata ostvarenih u svetu u oblasti molekularne biologije, u protekloj godini, u kojima su naši naučnici dali svoj doprinos. U ovom broju, prikazano je 18 naučnih radova, od kojih je 12 iz oblasti biomedicine, koji su posvećeni rezultatima ostvarenim u oblasti molekularne biologije retkih bolesti, tumora i centralnog nervnog sistema. Ovi rezultati su od ogromnog značaja za unapređenje dijagnostike i terapije bolesti.

Rezultati koje su naši naučnici ostvarili u oblasti molekularne biologije biljaka prikazani su kroz tri rada, a akcenat u njima je na mogućnosti primene tih rezultata u oblasti ekologije, hortikulture i unapređenja zdravlja ljudi (potraga za ekološki prihvatljivim bioherbicidima, modifikacija boje cveta, biološka aktivnost prirodnih supstanci).

Dva rada su posvećena naprednim metodama u oblasti molekularne biologije i prikazana su u posebnom poglavlju, što smatram veoma važnim.

Posebno bih istakla poglavlje u kojem je prikazan jedan od najznačajnijih naučnih rezultata u svetu u protekloj godini (otkiće receptora za temperaturu i dodir), za koji je dodeljena Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 2021. godine. Uvodno poglavlje ovog tematskog zbornika posvećeno je značajnom jubileju – pedesetogodišnjici Beogradske škole molekularne biologije, i u njemu je prikazan razvojni put studijskog programa Molekularna biologija i fiziologija na Univerzitetu u Beogradu – Biološkom fakultetu.

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ nastavlja svoju misiju naučne avangarde započetu prošlogodišnjim brojem. Prikazivanjem najkvalitetnijih i najznačajnijih naučnih rezultata ostvarenih u oblasti molekularne biologije u protekloj godini u kojima su naši mladi naučnici dali svoj ogromni doprinos, prenose se informacije širem krugu istraživača i zaposlenih u različitim oblastima (medicina, farmacija, poljoprivreda), čime se otvaraju mogućnosti za saradnju, a samim tim za primenu rezultata, kao i za nova istraživanja.

Svojom koncepcijom i odabirom radova „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ prate napredak u oblasti molekularne biologije i ne samo da prenose najznačajnije naučne rezultate, već i inspirišu i podstiču nova istraživanja i šire interesovanje za ovu veoma značajnu naučnu oblast. Ovaj zbornik opravdava svoj naziv i nadam se da će se nastaviti trend njegovog objavljivanja i narednih godina.

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

Monografija/Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ je drugi broj u nizu izdanja koje ima za cilj da prikaže naučne rezultate iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije u prethodnoj godini. Sačinjen je od 18 poglavlja, od kojih 8 predstavlja revijske radove proizašle iz doktorskih disertacija mladih doktora nauka u kojima je prikazan njihov doprinos određenoj naučnoj oblasti molekularne biologije koja je povezana sa temom njihove disertacije. Preostalih 7 poglavlja su prikazi aktuelnih tema iz molekularne biologije u kojima su naši naučnici dali svoj značajni doprinos. Uvodno poglavlje je posvećeno jubileju, pedesetogodišnjici Beogradske škole molekularne biologije, u kome je prikazan put razvoja programa za molekularnu biologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Veliki broj poglavlja iz Zbornika (12) je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. Posebno je značajno poglavlje u kome je prikazan doprinos naših istraživača u oblasti kojoj je dodeljena Nobelova nagrada iz medicine za 2021. godinu (receptori za temperaturu i dodir).

Doprinos koji je molekularna biologija dala modernoj medicini je izuzetno veliki. Danas su u kliničkoj praksi u svetu 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. Ovaj Tematski zbornik je svedočanstvo o značajnim postignućima molekularnih biologa u Srbiji koji su doneli napredak našoj medicini i drugim naučnim oblastima.

Monografija/Zbornik je izuzetno zanimljivo koncipiran sa sadržajem koji je na visokom naučnom nivou i koje je značajan izvor informacija za veliki broj naučnika u Srbiji čija se istraživanja više ne mogu zamisliti bez molekularne biologije. Primeri primenljivosti rezultata istraživanja u praksi (medicinskoj i drugima) je poseban kvalitet ovog Zbornika.

Prvi broj Tematskog zbornika „Trendovi u molekularnoj biologiji 1“ je doživeo veliko interesovanje. Interesovanje autora da objave svoj doprinos svetskoj nauci u broju 2 govori da je ovakav sadržaj bio neophodan našoj naučnoj javnosti. Sigurno je da će ovako koncipiran Tematski zbornik imati budućnost, jer je napredak medicine i drugih oblasti (biotehnologija, poljoprivreda, farmacija) nemoguće zamisliti bez novih dostignuća molekularne biologije

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

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ sadrži naučne rezultate koji su prepoznati na svetskom nivou, a koje su istraživači iz Srbije ostvarili u prethodnoj godini iz ove oblasti. Zbornik je sačinjen od 18 poglavlja, preglednih radova, grupisanih u pet celina. Prva celina je posvećena važnom jubileju, pedesetogodišnjici osnivanja Beogradske škole molekularne biologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, dok druga sadrži prikaz rezultata naših istraživača iz oblasti fiziologije i medicine za koju je u 2021. godini dodeljena Nobelova nagrada. Najveći broj poglavlja je u okviru treće celine koja se bavi biomedicinom i to molekularnom biologijom retkih bolesti, tumora i centralnog nervnog sistema. Preostale dve celine su posvećene molekularnoj biologiji biljaka i naprednim metodama molekularne biologije. Važno je istaći da su mladi doktori nauka aktivno učestvovali u izradi ovog Zbornika, tako da 8 poglavlja u okviru biomedicine i molekularne biologije biljaka predstavljaju revijske radove proizašle iz njihovih doktorskih disertacija.

Značaj ovog Zbornika je višestruk. Najpre, već drugu godinu za redom se objavljuju najrelevantnija saznanja iz navedenih oblasti koja su proizašla iz rada istraživača iz Srbije i dostupna su široj javnosti na maternjem jeziku. Takođe, svoje radove su napisali istraživači iz različitih naučnih instituta (5) i fakulteta (5) iz Srbije, što ohrabruje da će se u našoj zemlji i dalje nastaviti sa istraživanjima u molekularnoj biologiji koja su aktuelna u svetu.

„Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ je Tematski zbornik u kome su objedinjeni rezultati fundamentalnih i primenjenih istraživanja u molekularnoj biologiji ostvarenih u našoj zemlji u prethodnoj godini. Korišćenjem najnovijih metodoloških pristupa u ovoj oblasti, ali i bioinformatičkih i drugih softverskih alata, postignut je značajan napredak u dijagnozi i primeni novih strategija lečenja mnogih bolesti, forenzičkim analizama, razvoju novih lekova. Ovaj sveobuhvatni prikaz istraživanja, koja se aktivno sprovode u naučnim institutima i na fakultetima u Srbiji, doprinosi saznanjima o značaju koji molekularna biologija ima kako u humanoj i veterinarskoj medicini, poljoprivredi, farmaciji, tako i u razvoju biotehnologije, očuvanju životne sredine i biodiverziteta.

Poseban doprinos Zbornika se ogleda u tome što se u njemu nalaze aktuelni podaci o dostupnosti navedenih savremenih metodologija, čime se otvaraju realne mogućnosti za uspostavljanje novih saradnji među istraživačima, kao i u uspostavljanju inter- i multi-disciplinarnosti i daljem razvoju nauke u Srbiji.

Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Geni-modifikatori β -talasemijskih sindroma – novi terapijski pristupi

Milena Ugrin

Laboratorija za molekularnu biomedicinu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija
Kontakt: milena.ugrin@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

β -talasemijski sindromi predstavljaju veoma heterogenu grupu naslednih oboljenja hemoglobina koje odlikuje poremećena sinteza β -globinskog lanca. Kliničke manifestacije β -talasemijskih sindroma variraju od asimptomatskog do teškog oblika ovih oboljenja koje odlikuje zavisnost pacijenata od čestih transfuzija. Velika fenotipska varijabilnost karakteristična za β -talasemije koja se najčešće ne može objasniti samo različitim alelskim varijantama unutar β -globinskog gena, usmerila je istraživanja ka genima modifikatorima ovih sindroma. Naime, smatra se da bilo koji faktor koji dovodi do smanjenja disbalansa između α - i β -globinskih lanaca predstavlja potencijalno važan modifikator β -talasemijskih sindroma. Tako, sinteza fetalnog hemoglobina i u adultnom dobu, delimično ublažava kliničku sliku jer se nedostatak funkcionalnog β -globinskog lanca kompenzuje viškom fetalnih, γ -globinskih lanaca. Brojne GWAS studije ukazale su na postojanje varijanti i van β -globinskog genskog lokusa koje utiču na ekspresiju γ -globinskih ili stabilnost α -globinskih lanaca, a samim tim i na fenotip β -talasemijskih sindroma (*HBS1-MYB*, *BCL11A*, *AHSP*, *FoP*, *KLF1*).

Do skora, transplantacija kosne srži je bio jedini vid terapije β -talasemijskih sindroma, međutim usled visoke stope morbititeta i mortaliteta ove vrste terapije, alternativne strategije kao što su genska terapija i razvoj indukovanih pluripotentnih stem ćelija se ubrzano razvijaju.

Cilj genske terapije β -talasemijskih sindroma je indukcija produkcije β - ili γ -globinskih lanaca kao i smanjenje α/β disbalansa u eritrocitima. Za transfer gena u genskoj terapiji koriste se različite vrste vektora, kako ne-virusni, tako i virusni. Napredak na polju razvoja različitih vrsta vektora, transdukcije humanih stem i progenitor ćelija, kao i različitih metoda editovanja samih gena, daje nadu da će u bliskoj budućnosti genska terapija biti terapija izbora za β -talasemijske sindrome.

Ključne reči: β -talasemijski sindromi, sekundarni geni modifikatori, genska terapija, iPSC

Gene modifiers in β -thalassemia syndromes – a new therapy approach

Milena Ugrin

Laboratory for Molecular Biomedicine, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering

University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Correspondence: milena.ugrin@imgge.bg.ac.rs

Abstract

The β -thalassemia syndromes are heterogeneous hereditary hemoglobin disorders, characterized by defect in β -globin chain synthesis. Clinical manifestations of β -thalassemia vary from severe, transfusion-dependent thalassemia major to mild, asymptomatic thalassemia trait. This phenotypic variability characteristic for β -thalassemia that usually cannot be explained only by variations affecting β -globin gene, swayed researchers toward identifying genetic modifiers for these disorders. Namely, any factor that reduces the imbalance between α - and β -globin polypeptide chains is considered to be an important modifier of this disorder. Specifically, production of fetal hemoglobin through adulthood could ameliorate the severity of β -thalassemia phenotype since γ -globin polypeptide chains compensate for the lack of the functional β -globin ones. GWAS studies have shown that regions outside of the β -globin gene cluster are also implicated in γ -globin gene expression regulation and α -globin chain stability, and hence, play an important role in β -thalassemia phenotype (*HBS1-MYB*, *BCL11A*, *AHSP*, *FoP*, *KLF1*).

Until recently, a definitive cure for β -thalassemia could only be achieved through bone marrow transplantation. However, since its significant risk of morbidity and mortality, an alternative strategies, such as gene therapy and development of induced pluripotent stem cells have been explored. The goal of β -thalassemia gene therapy is the induction of β - or γ -globin polypeptide chains, as well as the reduction of α/β -chain disbalance in erythrocytes. Various types of vectors have been considered for gene transfer, including non-viral and viral. Recent improvements in vector biology and development, human stem cell transduction, as well as the availability of new gene-editing methodology, pave the way towards introduction of gene therapy as a go-to therapy for β -thalassemia syndromes.

Keywords: β -thalassemia syndromes, secondary gene modifiers, gene therapy, iPSC

Hemoglobinopatije

Hemoglobinopatije predstavljaju heterogenu grupu naslednih anemija i posledica su mutacija u genima koji kodiraju globinske polipeptidne subjedinice molekula hemoglobina. Ova oboljenja obuhvataju kvalitativne i kvantitativne poremećaje.

Kvalitativne hemoglobinopatije, koji se najčešće nazivaju hemoglobinskim varijantama ili strukturnim hemoglobinopatijama, posledica su varijacija u aminokiselinskoj sekvenci molekula hemoglobina. Karakterišu se prisustvom normalne količine mutiranih globinskih polipeptida, koji doprinose formiranju molekula hemoglobina izmenjenih fizičkih i hemijskih svojstava.

Kvantitativni hemoglobinski poremećaji posledica su odsustva ili smanjene sinteze jednog ili više polipeptidnih lanaca i označavaju se terminom "talasemije". Talasemije se obično klasifikuju prema tipu globinskog lanca koji nedostaje i uključuje dva najčešća oblika ovog oboljenja - α -talasemiju i β -talasemiju. Pored ova dva oblika talasemijskih poremećaja, treba napomenuti da su definisane i druge vrste talasemija kao što su δ -, $\delta\beta$ - i $\gamma\delta\beta$ -talasemije.

U praksi, međutim, granica između kvalitativnih i kvantitativnih hemoglobinopatija nije tako stroga. Naime, pokazano je da postoje hemoglobinske varijante (Hb E, Hb Lepore, Hb Constant Spring) čiji se izmenjeni polipeptidi sintetišu i u smanjenoj meri, te stoga predstavljaju talasemijski poremećaj. Usled ovakvih otkrića uveden je pojam "talasemijski sindromi" koji obuhvata sve nasledne anemije koje se karakterišu defektom u sintezi jednog ili više globinskih lanaca hemoglobinskog tetramera (1).

β -talasemijski sindromi

β -talasemijski sindromi su jedni od najčešćih autozomalno recesivnih naslednih oboljenja, sa visokom učestalošću u populacijama Mediterana, Bliskog istoka, Centralne Azije, Indijskog podkontinenta i Dalekog istoka (2). Karakterišu se odsustvom (β^0 -talasemije) ili smanjenom sintezom (β^+ -talasemije) β -globinskog lanca adultnog hemoglobina (HbA; $\alpha_2\beta_2$). Rezultat ove izmenjene sinteze globinskih lanaca je smanjena produkcija funkcionalnog tetramernog hemoglobina što dovodi do hipohromije (smanjen udeo hemoglobina u eritrocitima) i mikrocitoze (smanjena veličina eritrocita). Takođe, višak slobodnih α -globinskih lanaca precipitira u prekursorima eritrocita u kosnoj srži, kao i u crvenim krvnim zrnima u cirkulaciji što rezultira kraćim životnim vekom samih eritrocita a samim tim vodi ka neefikasnoj eritropoezi i hemolitičkoj anemiji (3).

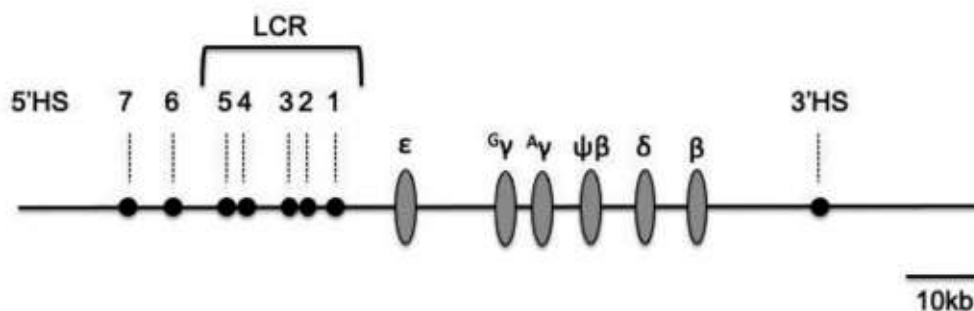
Kliničke manifestacije anemije izazvane β -talasemijama variraju od talasemije major, teškog oblika ovog oboljenja koje se karakteriše kontinuiranom potrebom za transfuzijom krvi, do blage, neprogresivne talasemije minor. Talasemija intermedija predstavlja srednje težak poremećaj kod kog ne dolazi do značajnog smanjenja sinteze odgovarajućeg globinskog lanca i karakteriše se velikom fenotipskom varijabilnošću (4).

β -globinski genski lokus

Adultni β -globinski gen (*HBB*) lociran je u okviru β -globinskog genskog lokusa smeštenog na terminalnom delu kraćeg kraka hromozoma 11 (11p15.5) i proteže se preko 70 kb. Ovaj klaster globinskih gena, pored *HBB* gena, sadrži jedan pseudogen ($\psi\beta$ pseudogen) kao i još četiri funkcionalna globinska gena: ϵ gen, koji kodira embrionalni globinski lanac, gene $\zeta\gamma$ (*HBG2*) i $\Lambda\gamma$ (*HBG1*), koji kodiraju fetalne, γ -globinske lanace i δ -globinski gen (*HBD*) koji kodira istoimeni adultni globinski lanac. Redosled ovih pet funkcionalnih globinskih gena u klasteru β -globinskih gena odgovara radosledu njihove ekspresije tokom ontogenetskog razvića (5).

Uzvodno od β -globinskog lokusa, na udaljenosti 6-20 kb od ϵ -globinskog gena, nalazi se LCR (eng. *Locus Control Region*), regulatorni region koji sadrži 5 DNAza 1 hipersenzitivnih mesta (HS) (Slika 1). Zajedno sa 5' i 3' HS, LCR igra odlučujuću ulogu u ekspresiji svih β -globinskih gena održavajući hromatin u otvorenom stanju, sa jedne strane, i delujući kao veoma jak enhanser transkripcije globinskih gena, s druge strane. Uloga pojedinačnih hipersenzitivnih mesta još uvek nije u potpunosti poznata, mada su istraživanja pokazala da su HS2 i HS3 veoma važni u procesima transkripcije, te da delecija nekog od ovih hipersenzitivnih mesta dovodi do smanjene transkripcije za oko 30% (4, 6).

Tokom fetalnog razvića i prvih šest meseci života čoveka, u okviru β -globinskog genskog lokusa dolazi do veoma složenog obrasca geneske ekspresije koji se naziva hemoglobinski "switch". Naime, tokom ranog razvića dolazi do povećane ekspresije embrionalnog globinskog gena, a kasnije, tokom fetalnog razvića, aktiviraju se geni neophodni za sintezu γ -globinskih polipeptidnih lanaca (*HBG1*; *HBG2*). Ovi γ -globinski lanci, zajedno sa α -globinskim lancima, formiraju tetramer fetalnog hemoglobina (HbF; $\alpha_2\gamma_2$). Ubrzo nakon rođenja dolazi do molekulskog "switch"-a, odnosno dolazi do prestanka sinteze γ -globinskih lanaca i početka produkcije β -globinskih lanaca a fetalni hemoglobin biva zamenjen adultnim, HbA hemoglobinom (7, 8).



Slika 1. Struktura β -globinskog genskog klastera.

Geni modifikatori β -talasemijskih sindroma

β -talasemija je uzrokovana jednom od preko od 300 tačkastih mutacija ili, ređe, delecija koje pogađaju sam *HBB* gen ili okolne sekvence (9). Međutim, genotipska varijabilnost u datom lokusu često nije dovoljna da bi objasnila veliku fenotipsku varijabilnost koja se javlja kod pacijenata sa istim genotipom (10). Ovakva klinička varijabilnost karakteristična za β -talasemijske sindrome usmerila je istraživače ka proučavanju genetičkih modifikatora datih oboljenja što bi potencijano moglo dovesti do razvoja specifičnih i delotvornijih terapijskih pristupa (11). Genetički modifikatori mogu delovati na tri nivoa: primarni, sekundarni i tercijarni.

Primarni modifikatori se obično odnose na vrstu mutacije koja pogađa sam β -globinski gen. Lokacija mutacija u različitim funkcionalnim regionima gena određuje težinu kliničke slike, pa su tako mutacije i podeljenje na mutacije koje utiču na transkripciju β -globinskog gena (promotorske i 5' UTR mutacije), mutacije koje utiču na obradu β -globinske iRNK (mutacije koje menjaju mesta iskrajanja, mutacije koje kreiraju alternativna mesta iskrajanja, 3' UTR mutacije) i mutacije koje utiču na iRNK translaciju ("nonsense", "frameshift", mutacije inicijacionog kodona) (2). Mutacije koje utiču na transkripciju uglavnom rezultuju min-

imalnim deficitom β -globinskog lanca i reflektuju se u relativno blagom fenotipu. Tako mutacija C>T na poziciji -101 uzvodno od početka transkripcije β -globinskog gena dovodi do veoma blagog deficita β -globina, u tolikoj meri da je asimptomatski kod heterozigota sa normalnim nivoom HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) (4). Mutacije koje utiču na obradu β -globinske iRNK pogađaju kako donorsko i akceptorsko mesto u intronima, tako i konsenzusne sekvence koje okružuju ova mesta. Mutacije koje dovode do promene u sekvenci donorskog i akceptorskog mesta iskrajanja onemogućavaju sintezu funkcionalne iRNK tako da se β -globinski lanci uopšte ne sintetišu i dolazi do β^0 -talasemije. S druge strane, mutacije koje pogađaju konsenzus sekvence koje se nalaze oko donorskog i akceptorskog mesta iskrajanja smanjuju efikasnost normalnog iskrajanja od 70% do 95% i dovode do β^+ -talasemije (5). Drugi tip mutacija u okviru ovih konsenzus sekvenci favorizuje obradu na "pogrešnim" tj. kriptičnim mestima iskrajanja. Iskrajanje iRNK na ovim mestima dovodi do produkcije nefunkcionalne iRNK što rezultira fenotipom β^+ -talasemije. Do blaže kliničke slike β -talasemije dovode i mutacije u okviru CAP regiona, kao i mutacije koje utiču na poliadenilaciju (12). Mutacije koje narušavaju translaciju iRNK bilo u fazi inicijacije ili elongacije, povezane su sa fenotipom β^0 -talasemije. Većina ovih poremećaja rezultat su uvođenja novog terminacionog kodona usled promene okvira čitanja ili kao posledica *nonsense* mutacija i gotovo kod svih dolazi do terminacije u okviru prvog ili drugog egzona (13).

Sekundarni modifikatori uključuju varijante u genima koji utiču na balans α/β -globinskih lanaca kao što su α - i γ -globinski geni, kao i varijante u genima uključenim u ekspresiju γ -globinskih gena (*HBS1-MYB*, *BCL11A*, *KLF1*, *C1orf77*) i stabilnost α -globinskih lanaca (*AHSP*). Ovi modifikatori obuhvataju gene kako u okviru globinskih genskih lokusa, tako i van njih. Poslednjih godina brojna istraživanja su usmerena ka proučavanju sekundarnih genskih modifikatora kao faktora koji dovode do blaže kliničke slike β -talasemijskih sindroma. Naime, nastavak sinteze fetalnih, γ -globinskih polipeptida, a samim tim i fetalnog hemoglobina (HbF) kod adulta, delimično ublažava kliničku sliku β -talasemijskih sindroma jer se nedostatak funkcionalnog β -globinskog lanca kompenzuje viškom γ -globinskih lanaca. Ova činjenica je iskorišćena pri razmatranju sekundarnih modifikatora kao potencijalnih targeta genske terapije β -talasemijskih sindroma (14).

Tercijarni modifikatori predstavljaju varijante u genima koje utiču na komplikacije izazvane β -talasemijskim sindromima kao što su hiperbilirubinemija, progresivna osteoporoza i osteopenija, trombofilija, kardiopatije i bubrežna oboljenja (15-17). Hiperbilirubinemija i sklonost ka nastajanju kamena u žuči je uobičajena komplikacija kod pacijenata sa β -talasemijom i rezultat je ubrzane hemolize eritrocita pri čemu je bilirubin produkt razlaganja hemoglobina. Proučavanja su pokazala da su nivoi bilirubina i pojavljivanje kamena u žuči kod β -talasemija povezani sa polimorfnom varijantom (7 TA ponovaka) u promotorskom regionu gena za uridin-difosfat – glukoniltransferazu 1A (*UGT1A*), što se još naziva i Žilberov sindrom. Pokazano je da je (TA)₇ varijanta povezana sa povišenim nivoom bilirubina i kod anemije srpastih ćelija i drugih hemolitičkih anemija (18-20).

Progresivna osteoporoza i osteopenija je još jedna uobičajena komplikacija koja se sreće kod mlađih pacijenata sa β -talasemijom (21). Lokusi za koje se pretpostavlja da čine genetičku osnovu formiranja koštane mase uključuju gen za receptor za estrogen, gen za receptor vitamina D (*VDR*; vitamin D receptor, eng.), gen za kolagen tipa $\alpha 1$ i $\alpha 2$ (*COLA1*, *COLA2*) kao i gen za transformišući faktor rasta $\beta 1$ (*TGF β 1*) (13). Talasemija je praćena i hiperkoagulacionim stanjem (22). Genetički faktori rizika za tromboze, kao što su mutacije u genu za Faktor V, Faktor II i metilentetrahidrofolat reduktazu (*MTHFR*), mogu značajno da doprinesu pojavi i oštećenjima nastalim usled pojave trombotičkih insulata a samim tim i fenotipu β -talasemijskih sindroma (23).

Sekundarni geni modifikatori β -talasemijskih sindroma

Geni modifikatori u okviru globinskih genskih lokusa

α -globinski geni

Klaster α -globinskih gena sadrži tri funkcionalna gena: gen ζ , koji kodira ζ -globinske lance i koji se ekprimira u embrionalnom stadijumu razvitka čoveka, i gene α_2 i α_1 (*HBA1* i *HBA2*) koji kodiraju α -globinski polipeptid od početnih faza gestacije i kasnije kroz čitav život. U lokusu α -globinskih gena locirana su i tri pseudogena (pseudo ζ , pseudo α_2 i pseudo α_1 geni), kao i θ -gen, identifikovan na samom 3' kraju lokusa, nepoznate funkcije (24). Iako se sa α -globinskih gena prepisuju identični adultni α -globinski lanci, *HBA2* gen je i do 3 puta aktivniji od *HBA1* gena, te se sa njega sintetiše i više polipeptidnih lanaca (25). Kao i β -talasemije, α -talasemije se odlikuju odsustvom (α^0 -talasemija) ili smanjenom sintezom (α^+ -talasemija) α -globinskih lanaca što dovodi do disbalansa između globinskih peptidnih lanaca. Većina α -talasemija izazvana je velikim delecijama koje obuhvataju jedan ili oba α -globinska gena na istom hromozomu (26).

U mnogim populacijama u kojima je β -talasemija veoma zastupljena, α -talasemija se takođe javlja sa visokom učestalošću što kao rezultat ima konasleđivanje oba ova oboljenja. U takvim slučajevima, homozigoti ili složeni heterozigoti za β -talasemijske varijante će imati blažu kliničku sliku jer će imati i manje nesparenih α -globinskih lanaca. Naime, fenotip β -talasemijskih sindroma zavisi kako od tipa mutacije koja pogađa sam *HBB* gen, tako i od broja funkcionalnih α -globinskih gena. Tako pacijenti kod kojih je detektovana varijanta u *HBB* genu u homozigotnom obliku, a pri tome imaju samo jedan funkcionalni α -globinski gen, prikazuju fenotip β -talasemije intermedije. Suprotno tome, ukoliko pacijent sa heterozigotnom mutacijom u *HBB* genu sintetiše višak α -globinskih lanaca usled duplikacije jednog od *HBA* gena, dolazi do pojave β -talasemije intermedije umesto do očekivane talasemije minor (27).

γ -globinski geni

Kao što je rečeno ranije, nakon ekspresije embrionalnih globinskih gena, γ -globinski geni koji kodiraju polipeptidne lance fetalnog hemoglobina (HbF) se sintetišu tokom perioda gestacije. Ubrzo nakon rođenja, γ -globinski lanci se zamenjuju β -globinskim lancima adultnog hemoglobina (HbA). Ovaj kompleksan proces genske ekspresije globinskih gena je klinički veoma važan obzirom da nastavak ekspresije γ -globinskih gena ili njihova reaktivacija može ublažiti fenotip β -talasemijskih sindroma (7, 8).

Nasledno prisustvo fetalnog hemoglobina (eng. *Hereditary persistence of fetal hemoglobin* - HPFH) je poremećaj koji se manifestuje nastavkom sinteze fetalnih, γ -globinskih polipeptida, a samim tim i fetalnog hemoglobina (1.6-30%) i kod adulta. Opisana su dva glavna tipa HPFH sindroma - pancelularni tip HPFH, koji se karakteriše veoma visokim nivoom sinteze HbF i njegovom uniformnom distribucijom u svim ćelijama crvene loze; i heterocelularni tip HPFH, koji je rezultat genetski determinisanog povećanja broja eritrocita koji sintetišu fetalni hemoglobin (F ćelije) (28, 29). Pancelularni tip HPFH se dalje može podeliti u dve klase i to prvu, koja nastaje kao posledica delecija i drugu, u čijoj osnovi leže tačkaste mutacije.

Delecione forme pancelularnog tipa HPFH posledica su velikih delecija unutar β -globinskog lokusa koje obuhvataju δ - i β -globinske gene i deo intergenskog regiona između γ - i δ -globinskih gena. Objašnjenje koje se može ponuditi za povećanu ekspresiju i pancelularnu distribuciju HbF kod ovih sindroma je činjenica da ovakvi genski rearanžmani dovode udaljene enhansere u blizinu γ -globinskih gena, te da dolazi do interakcije pozitivnih regulatora ovih gena sa dodatnim enhanserom (30, 31).

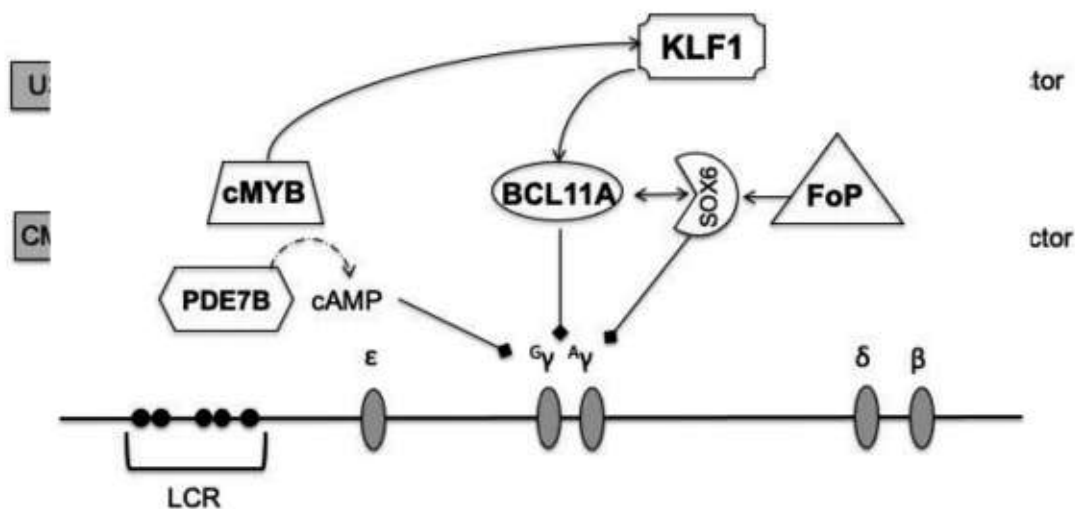
Nedelecione forme HPFH su najčešće rezultat zamene jedne baze u promotorima γ -globinskih gena (28). Ovakve tačkaste mutacije javljaju se u okviru mesta vezivanja transkripcionih faktora i uglavnom su grupisane u tri regiona - oko pozicija -114 do -117, na poziciji -175, i na pozicijama od -195 do -202 nukleotida (32). Region na poziciji -117 je distalni CCAAT blok, koji vezuje opšte CP1 i CDP transkripcione faktore i eritroidno-specifične GATA-1 i NF-E3. Mutacije u ovom regionu dovode do slabije interakcije CCAAT bloka i eritroidno-specifičnih transkripcionih faktora (33). Region u kome se nalazi mutacija g.-175T>C sadrži vezivna mesta za GATA-1 transkripcioni factor, dok mutacije koje pogađaju region od -195 do -202 nukleotida utiču na afinitet vezivanja Sp1 transkripcionog faktora (34).

Heterocelularni tip HPFH često je posledica mutacija van β -globinskog genskog lokusa. Pacijenti koji se karakterišu ovim sindromom sadrže veliki broj F ćelija u adultnom periodu života, dok je nivo HbF je obično znatno niži nego kod pancelularnog tipa HPFH (30). U nekim slučajevima, povišen nivo fetalnog hemoglobina javlja se kod zdravih pojedinaca, dok se kod drugih, povišena sinteza HbF detektuje tek u uslovima eritroidnog stresa karakterističnim za β -talasemijske sindrome (30, 31).

Jedna od najčešćih genetičkih varijanti koja svoj efekat ispoljava u uslovima eritroidnog stresa je i *XmnI*- γ^G (g.-158 C>T) varijanta. Naime, klinička ispitivanja su pokazala da, u uslovima hematopoetskog stresa, kao što je slučaj kod homozigotne β -talasemije i anemije srpastih ćelija, prisustvo *XmnI* polimorfizma dovodi do povećanja ekspresije HbF (35). Međutim, povišen nivo HbF usled prisustva ove varijante je umeren i u nekim slučajevima ne može objasniti veliku fenotipsku varijabilnost β -talasemijskih sindroma (36). Takođe treba pomenuti i HBG1:g.-225_-222delAGCA varijantu, deleciju u promotorskom regionu γ -globinskog gena za koju je pokazano da utiče na ekspresiju ovog fetalnog globinskog gena samo u uslovima eritroidnog stresa (37).

Geni modifikatori van globinskih genskih lokusa

Brojni transkripcioni faktori su uključeni u regulaciju ekspresije γ -globinskih gena (Slika 2).



Slika 2. Transkripcioni faktori uključeni u regulaciju ekspresije γ -globinskih gena. Linijom sa strelicom na kraju označena je pozitivna regulacija (aktivacija). Linije sa kvadratićem na kraju označavaju negativnu regulaciju (represiju). Isprekidana linija označava nejasnu interakciju. Linija sa strelicama na oba kraja označava uzajamnu regulaciju.

HBS1L-MYB intragenski region

Varijante u *HBS1L-MYB* intergenskom regionu doprinose sa više od 20% varijacijama u nivou HbF, detektovanim u zdravim populacijama u Evropi. Većina ovih varijanti javljaju se u okviru segmenta dugog 79 kb i raspoređene su u tri bloka koja su obeležena kao HMIP 1, 2 i 3 (eng. *HBS1L-MYB intergenic polymorphism* – HMIP). Genetičke varijante koje pokazuju najveći efekat na nivo HbF locirane su u okviru 24 kb dugog regiona HMPI 2 bloka. Polimorfizmi za koje je pokazana asocijacija sa nivoom HbF uključuju, između ostalih, polimorfizme rs9399137, rs28384513 i rs4895441 (38, 39).

Mehanizam koji omogućava ovim genetičkim varijantama da utiču na nivo HbF još uvek nije u potpunosti razjašnjen, ali rezultati brojnih studija ukazuju da se ovaj biološki efekat ostvaruje preko regulacije okolnih gena, tj. *HBS1L* i *MYB* gena. Naime, pokazano je da ovaj inetergenski region ima ulogu regulatornog elementa na šta ukazuje postojanje mesta vezivanja transkripcionih faktora kao što je GATA-1 (39). Smatra se da ovaj regulatorni region kontroliše ekspresiju *MYB* gena koji kodira eritroidni transkripcioni faktor, što dalje utiče na eritroidnu diferencijaciju i, indirektno, na nivo HbF. Naime, *MYB* transkripcioni faktor igra važnu ulogu u procesima ćelijske proliferacije i diferencijacije i predstavlja negativni regulator ekspresije HbF preko kog brojni drugi faktori, kao što su mikro RNK (miR-15a i miR-16-1) mogu uticati na nivo fetalnog hemoglobina (40, 41).

Lokus u kome se nalazi *HBS1L-MYB* intragenski region (6q22–23) sadrži i druge potencijalne gene kandidate koji učestvuju u regulaciji sinteze HbF. Oni uključuju *PDE7B* gen (eng. *Phosphodiesterase 7*), *MAP3K5* gen (eng. *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5*) kao i *PEX7* gen (eng. *Peroxisomal biogenesis factor 7*) (42). Istraživanja su pokazala da se kratki tandemski ponovci u u promotoru *MAP3K5* gena, kao i intronske varijante kako u *MAP3K5*, tako i u *PDE7B* genu mogu dovesti u vezu sa smanjenim HbF nivoom a time i sa težom kliničkom slikom β -talasemijskih sindroma (43). Iako uloga *MAP3K5* proteina kao prenosnika signala kroz citoplazmu, u eritropoezi nije u potpunosti jasna, *PDE7B* gen bi mogao biti uključen u regulaciju fetalnog hemoglobina vezujući se za cAMP kao inhibitor γ -globinske genske ekspresije (44).

BCL11A gen

BCL11A (B-cell CLL/lymphoma 11A) je transkripcioni represor aktivan u B-limfocitima koji se eksprimira i u eritroidnim ćelijama. Ovaj protein sa DNK vezujućim domenom u vidu "cinkanog prstića" (eng. *zinc-finger*) kodiran je od strane istoimenog gena koji se prostire sa preko 102 kb na hromozomu 2p16 (45).

U GWAS studijama ustanovljeno je postojanje veze između genetičkih varijanti u okviru *BCL11A* gena i nivoa HbF u različitim populacijama (46). Tačnije, oko 15% ukupne varijabilnosti u nivou HbF moglo se pripisati polimorfizmima nađenim u drugom intronu *BCL11A* gena, kao što su rs11886868 i rs4671393 (36, 38). Daljim istraživanjima ustanovljeno je da je *BCL11A* represor γ -globinskih gena koji se ne vezuje direktno za promotorski region ovih gena, već za LCR, kao i za intergenski region između γ - i δ -globinskog gena, za koji je već pokazana asocijacija sa γ -globinskom genskom represijom (47, 48). Svoju represorsku ulogu *BCL11A* verovatno ostvaruje u interakciji sa brojnim transkripcionim faktorima kao što su jedarni deacetilazni kompleks (NuRD), eritroidni transkripcioni faktori, GATA-1 i FOG-1, kao i SOX6 za koga je pokazano da deluje kao represor embrionalnih globinskih gena kod miša (49).

Tvrđnja da *BCL11A* deluje kao represor γ -globinskih gena leži i u činjenici da je nivo ekspresije *BCL11A* gena u adultnom stupnju viši u odnosu na nivo ekspresije ovog gena u fetalnom stupnju razvića (49, 50). Kao direktni represor fetalnih globinskih gena, *BCL11A* je prvi genetički i biohemijski potvrđen faktor koji učestvuje u molekulskom "switch"-u globinskih gena. Kao takav, ovaj transkripcioni faktor predstavlja po-

tencijalni terapijski target protein za indukciju HbF (36). Međutim, obzirom da *BCL11A* funkcioniše kao transkripcioni faktor i u neeritroidnim ćelijama, novije studije su prepoznale eritroidne *BCL11A* enhansere koji se nalaze u drugom intronu *BCL11A* gena, kao potencijalne targete u genskoj terapiji β -talasemijskih sindroma. Na ovaj način bi promene u sekvenci drugog introna *BCL11A* gena imale uticaj na ekspresiju ovog gena isključivo u eritroidnim ćelijama (51).

GWAS studije pokazale su da varijante u okviru *HBB*, *HSB1L-MYB* i *BCL11A* gena mogu objasniti oko 50% varijacija u nivou HbF, ukazujući na postojanje dodatnih faktora koji utiču na produkciju fetalnih globinskih gena, odnosno sintezu fetalnog hemoglobina (38, 46, 52, 53). Neki od ovih faktora mogu biti regulatori ekspresije β -globinskih gena (*KLF1*), proteini odgovorni za stabilnost α -globinskih gena (*AHSP*) ili faktori uključeni u epigenetičku regulaciju ekspresije fetalnih globinskih gena (*FoP*).

KLF1 gen

Eritroidni Kruppel-Like Faktor, *KLF1* (*EKLF*), ključni je eritroidno-specifični transkripcioni faktor koji se vezuje za CACCC motiv, važan regulatorni element mnogih eritroidnih gena, uključujući *BCL11A* i β -globinski gen (54). Vezivanje *KLF1* transkripcionog faktora za ove motive ostvaruje se preko tri DNK vezujuća domena koji su neophodni za aktivaciju *KLF1* target gena. *KLF1* takođe sadrži i prolinom bogat transaktivacioni domen preko koga ovaj transkripcioni faktor vrši specifičnu aktivaciju *HBB*, direktno se vezujući za promotor ovog globinskog gena (55, 56). Ovaj transaktivacioni domen sastoji se od inhibitornog (AK 195-291) i aktivacionog (AK 20-124) domena. Ovaj minimalni aktivacioni region interaguje sa brojnim ćelijskim proteinima uspostavljajući, na taj način, optimalan aktivacioni potencijal. S druge strane, inhibitorni region funkcioniše tako što onemogućava efikasno vezivanje DNK vezujućeg domena za specifičnu DNK sekvencu (57).

Mutacije koje utiču na pomenute funkcije *KLF1* transkripcionog faktora bi potencijalno mogle da utiču i na ekspresiju globinskih gena.

Učestalost *KLF1* varijanti kreće se od 0.0004% to 37% u različitim populacijama (58-60). Ove varijante uključuju kako retke, tako i učestale promene u okviru *KLF1* gena i u zavisnosti od njihove lokalizacije, fenotipa koji izazivaju i uticaja koji imaju na transkripciju, mogu se podeliti u jednu od četiri klase varijanti (61).

Klasu 1 čine varijante koje predstavljaju neutrane polimorfizme kao što je varijanta p.Ser102Pro. Varijante koje pripadaju varijantama klase 2 uključuju „*missense*“ mutacije u DNK-vezujućem domenu i rezultiraju *KLF1* transkripcionim faktorom izmenjenog afiniteta vezivanja target sekvenci. Ove varijante doprinose mnogo blažem fenotipu od varijanti klase 3 koje uključuju „*frameshift*“ i mutacije koje uvode terminacioni kodon. Klasa 4 obuhvata grupu varijanti koje menjaju visoko konzervirana mesta u okviru DNK vezujućeg domena i dovode do veoma patološki ozbiljne kongenitalne diseritropoetske anemije (eng. *Congenital dyserythropoietic anaemia* - CDA). Varijante koje pripadaju klasi 2, 3 i 4 su fatalne u homozigotnom stanju te se sreću isključivo u heterozigotnom obliku (62).

Direktna asocijacija mutacija u okviru *KLF1* gena sa regulacijom sinteze hemoglobina ustanovljena je od strane Borg *et al.* (54) koji su pokazali da tačkasta mutacija u *KLF1* genu (p.K288X) u potpunosti ukida funkciju DNK vezujućeg domena, na taj način onemogućavajući ulogu *KLF1* kao transkripcionog faktora. Kao posledica, dolazi do smanjene ekspresije *BCL11A* gena, odnosno do smanjene sinteze *BCL11A*, represora fetalnih globinskih gena, što u krajnjem vodi ka povišenom nivou HbF (54, 63). Rezultati studije o prvoj *KLF1* promotorskoj mutaciji takođe idu u prilog činjenici da je *KLF1* važan regulator nivoa HbF. Naime, pokazano je

da ova *KLF1:g.-148G>A* varijanta dovodi do smanjene transkripcije *KLF1* gena, čime se donekle može objasniti detektovan HPFH fenotip (64, 65).

Studije o *KLF1* mutacijama, otvorile su vrata novim istraživanjima na polju humane eritropoeze. Novootkrivene i funkcionalno okarakterisane genetičke varijante u ovom i drugim genima modifikatorima β -talasemijskih sindroma (*BCL11A*, *HBS1L-MYB*), mogu poslužiti kao meta za gensku terapiju talasemija u budućnosti (54, 66-68).

AHSP

α Hb stabilizujući protein (eng. *α Hb-stabilizing protein* – AHSP) je eritroidno specifičan protein sa važnom ulogom u procesima eritropoeze. Naime, ovaj protein uključen je u savijanje, stabilizaciju i transfer α -globinskih lanaca prilikom formiranja tetramera hemoglobina. AHSP specifično vezuje brojne forme α -globina, uključujući "apo" formu (ne sadrži hem) i α -hemoglobin (α -globin sa hemom). Njegova uloga kao specifičnog molekularnog šaperona koji vezuje α -globinske lance hemoglobina sprečavajući, na taj način, precipitaciju istih, ukazuje da bi izmenjena ekspresija *AHSP* gena ili funkcija samog proteina mogla imati uticaj i na fenotip β -talasemijskih sindroma (69-71). Međutim, rezultati brojnih studija o ulozi *AHSP* kao gen modifikatora β -talasemijskih sindroma su kontradiktorna. Naime, dok su pojedina istraživanja pokazala da je smanjena ekspresija datog gena povezana sa težom kliničkom slikom β -talasemija (72, 73), drugi tvrde da *AHSP* ne predstavlja gen modifikator ovih oboljenja (74, 75). Međutim, postoji mogućnost da retke mutacije koje dovode do gubitka funkcije *AHSP* gena ili različiti epigenetički faktori mogu imati uticaj na fenotip već postojeće β -talasemije (70, 74).

FoP protein

FoP (eng. *Friend of Prmt1*) je mali arginin/glicin bogat protein kodiran od strane *C1orf77* gena. Ovaj protein, kroz interakciju sa proteinom PRMT1, uključen je u regulaciju transkripcije globinskih gena preko histonske metilacije (76). Istraživanja su pokazala je FoP ključan modulator nivoa HbF jer potpuno ukidanje njegove ekspresije dovodi do povećanog nivoa ekspresije γ -globinskih gena. Iako nije u potpunosti jasno kako FoP reguliše ekspresiju fetalnih globinskih gena, pretpostavlja se da se njihova indukcija vrši kroz modulaciju SOX6, kofaktora *BCL11A* transkripcionog faktora. Rezultati ovakvih istraživanja ukazuju na FoP kao novi potencijalni terapijski target kako β -talasemijskih sindroma, tako i drugih hemoglobinopatija (77).

Genska terapija

Uprkos velikim naporima na polju razvoja terapijskih tretmana β -talasemijskih sindroma, uključujući transfuziju i terapiju određenim lekovima, izlječenje ovih oboljenja do skora je bilo moguće samo prilikom alogene transplantacije hematopoetskih matičnih ćelija (78). Međutim, ova vrsta terapije dostupna je samo malom broju pacijenata sa β -talasemijom i karakteriše se visokom stopom mortaliteta i morbiditeta (79). Kao odgovor nauke na ova ograničenja i potrebom za trajnim rešenjem, proizašla je ideja o transferu terapijskih gena koristeći autologne hematopoetske stem ćelije kao potencijalna terapija β -talasemijskih sindroma.

Hematopetske matične ćelije, kao targeti genskog transfera, izdvajaju se iz koštane srži ili periferne krvi samog pacijenta, podležu *in vitro* genetičkim modifikacijama i, nakon kondicione hemoterapije pacijenta, vraćaju se u "domaćina" (80).

Cilj genske terapije β -talasemijskih sindroma je indukcija produkcije β - ili γ -globinskih lanaca, smanjenje količine slobodnih α -globinskih lanaca, kao i smanjenje α/β disbalansa u eritrocitima (81). Napredak na polju

razvoja različitih vrsta vektora, transdukcije humanih stem i progenitor ćelija, kao i različitih metoda editovanja samih gena, daju nadu da će u skoroj budućnosti genska terapija biti moguća terapija izbora za β -talasemijske syndrome (81).

Za transfer gena u genskoj terapiji koriste se različite vrste vektora, kako virusni, tako i ne-virusni (82).

Ne-virusni vektori

Naznaka da je genska terapija potencijalna terapija i talasemijskih sindroma, proizašla je iz istraživanja o supresor tRNK (83). U datoj studiji, *tRNALys* gen konvertovan je u amber-supresorski gen mesto-specifičnom mutagenozom antikodona. Kao rezultat dobijena je tRNK koja je suprimirala UAG amber mutaciju u RNK β^0 -talasemija usled čega dolazi do produkcije funkcionalnog β -globinskog polipeptida. Uprkos obećavajućim rezultatima ove vrste terapije, ona bi bila ograničena isključivo na β^0 -talasemijske sindrome, a ova supresor tRNK bi uticala na proces terminacije sinteze *wt* proteina što tRNK ne čini dobrim kandidat genima za upotrebu u genskoj terapiji.

Kao mogući pristup genske terapije lečenju hemoglobinskih oboljenja, iskorišćena su i katalitička svojstva ribozoma da vrše izmenu defektne iRNK koja se prepisuje sa mutiranog β -globinskog gena (84). Naime, iskorišćena je mogućnost *trans*-iskrajanja određene grupe ribozoma kako bi se mutirani β -globinski transkript preveo u RNK koja kodira γ -globinske polipeptidne lance. Na ovaj način mutirani adultni globinski gen zamenjuje se genom koji kodira fetalne globinske lance. Ovaj pristup genskoj terapiji, iako perspektivan, ukazao je na postojanje mnogih nedostataka kao što su dugotrajan efekat terapije koja je usmerena na proizvod transkripcije a ne mutirani gen (85).

Za razliku od ne-virusnih vektora, virusni vektori su pokazali veću efikasnost prilikom transfera gena obzirom da ne zahtevaju uslove transfera koji nepovoljno utiču na osetljive hematopoetske matične ćelije, kao što je elektroporacija (86).

Virusni vektori

Retrovirusni vektori

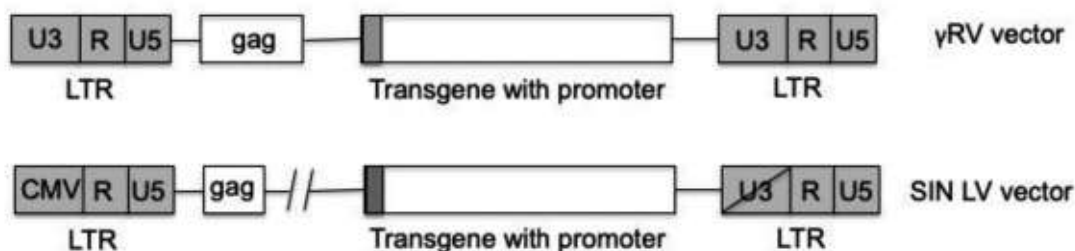
Među prvim virusnim vektorima koji su korišćeni za transfer humanog β -globinskog gena u mišije hematopetske matične ćelije, bili su γ retrovirusi (γ RV). Ovi viralni vektori konstruisani su tako što su genetički elementi neophodni za patogenost i replikaciju zamenjeni željenim transgenom (87).

γ RV vektori sadrže intaktne duge terminalne ponovke (eng. *long terminal repeats* – LTR) koji sadrže U5, R i region U3 velike promotorske aktivnosti koji služi za reverznu transkripciju i inkorporaciju virusnog genetskog materijala u ćeliju domaćina (Slika 3) (86). Prvi pokušaji transfera β -globinskog gena u mišije hematopetske matične ćelije pomoću ovih vektora, rezultirale su niskim nivoom ekspresije datog β -globinskog gena. Uvođenjem LCR regiona u γ RV vektore, prevaziđen je problem smanjene ekspresije transgena ali ne i varijabilnost u nivou ekspresije koja zavisi od mesta insercije transgena (85). Ograničenja γ RV vektora odnose se i na činjenicu da retrovirusni vektori ne mogu inficirati ćelije koje se ne dele, često uzrokuju hematopetske maligne bolesti zbog neprecizne ugradnje blizu ćelijskih protoonkogeni i ne mogu nositi veliku količinu genetskog materijala (79).

Iako su mnogobrojne modifikacije napravljene u γ -retrovirusnim vektorima, što je rezultiralo poboljšanom genskom ekspresijom, pravi napredak u genskoj terapiji se dogodio upotrebom lentivirusnih vektora.

Lentivirusni vektori

Lentivirusni vektori (LV) pokazuju nekoliko prednosti u odnosu na već pomenute retroviruse. Naime, pokazano je da imaju sposobnost da uđu i integrišu se u ćeliju koja se ne deli, što je za hematopoetske matične ćelije mnogo pogodnije obzirom na to da se ove ćelije češće nalaze u fazi mirovanja. Takođe, LV pokazuju visoku efikasnost transdukcije i mogu nositi veće i kompleksnije transgene kasete koje sadrže introne i regulacione elemente, što je potrebno za visok nivo ekspresije globinskih gena. Lentivirusni vektori imaju sigurniji integracijski profil od retrovirusa jer se najčešće ugrađuju unutar introna gena, na taj način izbegavajući regulatorne elemente blizu mesta početka transkripcije, što rezultira nižom genotoksičnošću i smanjenjem učestalosti insercijske onkogeneze (86, 88). Postizanje većeg nivoa bezbednosti kada je u pitanju integracija transgena pokušana je i dizajniranjem samoinaktivirajućih vektora (eng. *self-inactivating* – SIN). SIN-lentivirusni vektori imaju deleciju u virusnom promotoru/pojačivaču u U3 regionu LTR-a na 3'-kraju. Ta delecija se prilikom transkripcije kopira u 5'-LTR i smanjuje transaktivaciju susednih promotora, što čini vektor sigurnijim za korišćenje u terapijske svrhe (Slika 3) (89).



Slika 3. Genomska organizacija γ RV i SIN LV vektora.

Sa pronalaskom LV vektora neophodnih za transfer gena od interesa, istraživanja su okrenuta ka samoj kaseti globinskih gena. Naime, pristupi genskoj terapiji se trenutno mogu svrstati u dve kategorije – insercija celog gena i gensko editovanje.

Genska insercija

Ova vrsta genske terapije podrazumeva inserciju vektora koji sadrži β - i γ -globinske gene, kao i celokupnu regulatornu mašineriju, u autologe hematopoetske stem i progenitor ćelije (eng. *Human Stem and Progenitor Cells*-HSPC) *ex-vivo*, a zatim injektiranje ovako modifikovanih HSPC nazad u pacijenta koji je prethodno podvrgnut procesu mijeloablacije (89-91). Uprkos, naizgled, jednostavnoj proceduri, tehnološki napredak ovog pristupa zabeležen je tek u novije vreme. Naime, vektori koji nose *HBB* gen i njegove regulatorne elemente, uključujući delove LCR-a, od skora mogu biti proizvedeni u većoj količini, sa visokim nivoom čistoće i mogućnošću da transfekuju dovoljno veliki broj matičnih ćelija koje bi dovele do značajnog kliničkog odgovora (92, 93). Novije globinske kasete obično sadrže β -globinski gen sa deletiranim destabilišućim *RsaI* fragmentom lociranim u intronu 2, kao i sekvencama koje okružuju HS LCR-a. Međutim, broj i dužina HS regiona u globinskim kasetama varira obzirom da je teško precizno utvrditi regulatorne regione unutar svakog hipersenzitivnog mesta pojedinačno a pri tom ukinuti potencijalno destabilišuće regione (79).

Editovanje gena koje predstavlja ciljanu izmenu specifičnih target sekvenci u okviru datog gena, predstavlja alternativni pristup modifikacije HSPC u cilju genske terapije. Veliki napredak postignut je nakon uvođenja CRISPR/Cas9 (eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein*) sistema kao metode za precizno editovanje željenih genskih lokusa (94). Kao kandidat gen sa najvećim terapijskim potencijalom u GWAS studijama, proizašao je *BCL11A* gen. Dva novija klinička ispitivanja koja za cilj imaju povećanje nivoa fetalnog hemoglobina, oslanjaju se na ciljani prekid funkcije enhansera lociranog u drugom intronu *BCL11A* gena. Kao posledica uvedenih delecija, dolazi do smanjene *BCL11A* ekspresije u eritroidnim ćelijama a time i povećane ekspresije fetalnih globinskih gena (80). Iako osmišljeno da se putem specifično sintetisanih nukleaza postignu precizne genetičke modifikacije i izbegnu nespecifične integracije, glavni nedostatak modifikacije gena u terapijske svrhe β -talasemijskih sindroma i dalje predstavlja „off-target“ aktivnost samih nukleaza, odnosno mogućnost pojave neželjenih promena u nekom drugom delu genoma (81).

Aktuelni uspeh genske terapije

Prva uspešna genska terapija β -talasemijskih sindroma sprovedena je 2007. godine. Tom prilikom pacijent sa HbE/ β^0 -talasemijom tretiran je ekspimirajućim vektorom koji je sadržao β -globinski gen (β A(T87Q)), 260 bp globinski promotor, HS2, HS3, HS4 i dve kopije izolator sekvenci koji okružuju datu globinsku kasetu. Hb β 87 se ponaša kao fetalni Hb i interferira s polimerizacijom srpastog Hb-a, a funkcioniše normalno kao i HbA i u ekspresiji i u kapacitetu prenošenja kiseonika. Iako je ova terapija bila uspešna u smislu da pacijent nije više zahtevao redovne transfuzije krvi, analizom insercijskih mesta vektora pokazano je da većina terapijskog doprinosa potiče od dominantnog klona u kojem je integrisani vektor izazvao transkripcionu aktivaciju *HMGA2* gena, potencijalnog onkogeno. Mada je pokazano da povećana ekspresija *HMGA2* gena dovodi do pojave uglavnom benignih tumora, ovaj događaj je ukazao na nedostatke lentivirusnog transfera gena koji uključuju efikasnost i preciznost genske insercije (95).

Poslednjih godina, indukovane pluripotentne stem ćelije (eng. *induced pluripotent stem cells*-iPSCs) pokazale su se kao dobri kandidati za transfer gena. iPSC se uz pomoć različitih transkripcionih faktora, generišu iz somatskih ćelija poreklom iz fibroblasta kože, amnionske tečnosti ili horionskih čupica β -talasemijskih pacijenata. Naime, pokazano je da je ugradnja i ekspresija četiri različita gena (*Klf4*, *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*) dovoljna kako bi fibroblasti poreklom iz repa miša dobile karakteristike iPSC ćelija. Fibroblasti miša, homozigota za humani alel za srpastu anemiju (β S/ β S), konvertirane su u iPSC ugradnjom četiri pomenuta gena, a zatim je u njih elektroporacijom ubačena kratka sekvenca DNK β -globinskog gena koja sadrži sekvence potrebne za korekciju mutacije putem homologe rekombinacije. iPSC u kojima je došlo do ispravljanja mutacije izolovane su i gajene u većoj količini i tretirane faktorima rasta i mijeloidnim citokinima kako bi postale HSPC. Takve HSPC su transplantirane nazad u miša kod kog su dovele do izlečenja srpaste anemije (96).

iPSC ćelije su lako dostupne i predstavljaju neograničen izvor matičnih ćelija za gensku manipulaciju. Prednost ovih ćelija kada je reč o genskoj terapiji je mogućnost skrininga i odabira klona koji poseduje sigurnu integraciju transgena, kao i visok nivo njegove ekspresije. Međutim, postoje određene prepreke koje onemogućavaju iPSC ćelijama da budu korišćene u terapijske svrhe. Naime, potrebno je pronaći način kako bi se zaobišla upotreba štetnih onkogeno (kao što je *c-Myc*) kao transkripcionih faktora potrebnih za transformaciju ćelija u iPSC, izbeći upotrebu retrovirusnih vektora kao mehanizma dostave gena koji nose rizik od insercijske mutageneze i razviti pouzdane protokole za diferencijaciju ljudskih iPSC (79, 86, 87).

Zaključak

β -talasemijski sindromi su najviše istražena oboljenja na molekularnom nivou. Samim tim, terapijski protokoli β -talasemijskih sindroma predstavljaju primer potencijalno novih vrsta terapija kod različitih vrsta oboljenja.

Razvoj na polju sekvenciranja genoma, razumevanje genske regulacije *HBB* gena, pristupačnost nukleaza koje se koriste za editovanje gena, kao i tehnološki napredak kada je dizajniranje vektora u pitanju, dovelo je novih kliničkih studija na polju genske terapije β -talasemijskih sindroma. Za razliku od alogenske transplantacije HSC-a koja je do skora bila jedini način izlečenja β -talasemija, genska terapija ne zahteva postojanje odgovarajućeg donora, stoga bi se njenim razvitkom omogućilo dugoročno izlečenje većeg broja obolelih za koje, za sada, postoje samo tretmani koji ublažavaju simptome bolesti, ali ne predstavljaju dugoročno rešenje. Mada dugoročna efikasnost i bezbednosni profil ovog terapijskog pristupa još uvek nisu u potpunosti poznati, prvi rezultati datih kliničkih studija daju nadu da bi genska terapija β -talasemijskih sindroma mogla postati terapija budućnosti ovih oboljenja.

Zahvalnica

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-68/2022-14/200042.

LITERATURA

1. Pavlovic S. Molecular genetics and modern diagnostics of thalassemia syndromes. Serbia: IMGGE, Belgrade, Serbia; 2006. 140 p.
2. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med*. 2010;12(2):61-76.
3. Tangvarasittichai S. Thalassemia Syndrome. 2011. In: *Advances in the Study of Genetic Disorders* [Internet]. Rijeka: InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-the-study-of-genetic-disorders/thalassemia-syndrome>.
4. Thein SL. Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia. *Br J Haematol*. 2004;124(3):264-74.
5. Thein SL. Beta-thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol*. 1998;11(1):91-126.
6. Patrinos GP, de Krom M, de Boer E, Langeveld A, Imam AM, Strouboulis J, et al. Multiple interactions between regulatory regions are required to stabilize an active chromatin hub. *Genes Dev*. 2004;18(12):1495-509.
7. Forget BG. Progress in understanding the hemoglobin switch. *N Engl J Med*. 2011;365(9):852-4.
8. Sankaran VG, Orkin SH. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(1):a011643.
9. Mettananda S. Genetic and Epigenetic Therapies for β -Thalassaemia by Altering the Expression of α -Globin Gene. *Front Genome Ed*. 2021;3:752278.
10. Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med*. 2005;353(11):1135-46.
11. Lettre G. The search for genetic modifiers of disease severity in the β -hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(10).
12. Kazazian HH. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol*. 1990;27(3):209-28.
13. Thein SL. Genetic modifiers of beta-thalassemia. *Haematologica*. 2005;90(5):649-60.
14. Sonja P, Milena U, Maja S. Novel therapy approaches in beta thalassemia syndromes: a role of genetic modifiers. In: Anjana M, editor. *Inherited hemoglobin disorders*. Croatia: InTech; 2015. p. 137-60.
15. Demosthenous C, Vlachaki E, Apostolou C, Eleftheriou P, Kotsiafti A, Vetsiou E, et al. Beta-thalassemia: renal complications and mechanisms: a narrative review. *Hematology*. 2019;24(1):426-38.
16. Kumfu S, Fucharoen S, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Cardiac complications in beta-thalassemia: From mice to men. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017;242(11):1126-35.
17. Ali S, Mumtaz S, Shakir HA, Khan M, Tahir HM, Mughal TA, et al. Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies. *Mol Genet Genomic Med*. 2021;9(12):e1788.
18. Galanello R, Piras S, Barella S, Leoni GB, Cipollina MD, Perseu L, et al. Cholelithiasis and Gilbert's syndrome in homozygous beta-thalassaemia. *Br J Haematol*. 2001;115(4):926-8.
19. Thein SL. Genetic modifiers of the beta-haemoglobinopathies. *Br J Haematol*. 2008;141(3):357-66.
20. Ivanov A, Semenova E. Gilbert's Syndrome, Bilirubin Level and and UGT1A1*28 Genotype in Men of North-West Region of Russia. *J Clin Exp Hepatol*. 2021;11(6):691-9.
21. Yassin MA, Abdel Rahman MO, Hamad AA, Poil AR, Abdelrazek MT, Hussein RM, et al. Denosumab versus zoledronic acid for patients with beta-thalassemia major-induced osteoporosis. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(51):e23637.
22. Fayed MA, Abdel-Hady HE, Hafez MM, Salama OS, Al-Tonbary YA. Study of platelet activation, hypercoagulable state, and the association with pulmonary hypertension in children with β -thalassemia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2018;11(2):65-74.
23. Brankovic-Sreckovic V, Milic Rasic V, Djordjevic V, Kuzmanovic M, Pavlovic S. Arterial ischemic stroke in a child with beta-thalassemia trait and methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *J Child Neurol*. 2007;22(2):208-10.
24. Tang Y, Wang Z, Huang Y, Liu DP, Liu G, Shen W, et al. Gene order in human alpha-globin locus is required for their temporal specific expressions. *Genes Cells*. 2006;11(2):123-31.
25. Galanello R, Cao A. Gene test review. Alpha-thalassemia. *Genet Med*. 2011;13(2):83-8.
26. Grosso M, Sessa R, Puzone S, Storino MR, Izzo P. Molecular basis of thalassemia. 2012. In: *Anemia* [Internet]. Rijeka: InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/anemia/molecular-basis-of-thalassemia>.
27. Gilman JG, Huisman TH. DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. *Blood*. 1985;66(4):783-7.

28. Huang XD, Yang XO, Huang RB, Zhang HY, Zhao HL, Zhao YJ, et al. A novel four base-pair deletion within the Agamma-GLOBin gene promoter associated with slight increase of Agamma expression in adult. *Am J Hematol.* 2000;63(1):16-9.
29. Giardina P, Rivella S. Thalassemia syndromes. In: R H, EJ B, LE S, HE H, JI W, J A, editors. *Hematology, basic principles.* 6th edition ed. Philadelphia, USA: Elsevier; 2013.
30. Forget BG. The Thalassemia Syndromes. In: Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al., editors. *Hematology basic principles and practice.* Philadelphia, USA: Churchill Livingstone; 2000.
31. Sankaran VG, Xu J, Byron R, Greisman HA, Fisher C, Weatherall DJ, et al. A functional element necessary for fetal hemoglobin silencing. *N Engl J Med.* 2011;365(9):807-14.
32. Thein SL. Molecular control of fetal hemoglobin production and the implication for therapy. *Hematology education for European Hematology Association.* 2008;2(1):186-93.
33. Superti-Furga G, Barberis A, Schaffner G, Busslinger M. The -117 mutation in Greek HPFH affects the binding of three nuclear factors to the CCAAT region of the gamma-globin gene. *EMBO J.* 1988;7(10):3099-107.
34. Doerfler PA, Feng R, Li Y, Palmer LE, Porter SN, Bell HW, et al. Activation of γ -globin gene expression by GATA1 and NF-Y in hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet.* 2021;53(8):1177-86.
35. Kollia P, Kalamaras A, Chassanidis C, Samara M, Vamvakopoulos NK, Radmilovic M, et al. Compound heterozygosity for the Cretan type of non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin and beta-thalassemia or Hb Sabine confirms the functional role of the Agamma -158 C>T mutation in gamma-globin gene transcription. *Blood Cells Mol Dis.* 2008;41(3):263-4.
36. Sankaran VG, Lettre G, Orkin SH, Hirschhorn JN. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of hemoglobin disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1214:47-56.
37. Ugrin M, Stojiljkovic M, Zukic B, Klaassen K, Katsila T, Vasiljevic J, et al. Functional Analysis of an (A) γ -Globin Gene Promoter Variant (HBG1: g.-225_-222delAGCA) Underlines Its Role in Increasing Fetal Hemoglobin Levels Under Erythropoietic Stress. *Hemoglobin.* 2016;40(1):48-52.
38. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araújo AS, Uda M, Sanna S, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(33):11869-74.
39. Wahlberg K, Jiang J, Rooks H, Jawaid K, Matsuda F, Yamaguchi M, et al. The HBS1L-MYB intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. *Blood.* 2009;114(6):1254-62.
40. Sankaran VG, Menne TF, Šćepanović D, Vergilio JA, Ji P, Kim J, et al. MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(4):1519-24.
41. Stadhouders R, Aktuna S, Thongjuea S, Aghajaniarah A, Pourfarzad F, van Ijcken W, et al. HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers. *J Clin Invest.* 2014;124(4):1699-710.
42. Wyszynski DF, Baldwin CT, Cleves MA, Amirault Y, Nolan VG, Farrell JJ, et al. Polymorphisms near a chromosome 6q QTL area are associated with modulation of fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2004;50(1):23-33.
43. Tafrahi C, Paizi A, Borg J, Radmilovic M, Bartsakoulia M, Giannopoulou E, et al. Genomic variation in the MAP3K5 gene is associated with β -thalassemia disease severity and hydroxyurea treatment efficacy. *Pharmacogenomics.* 2013;14(5):469-83.
44. Bailey L, Kuroyanagi Y, Franco-Penteado CF, Conran N, Costa FF, Ausenda S, et al. Expression of the gamma-globin gene is sustained by the cAMP-dependent pathway in beta-thalassaemia. *Br J Haematol.* 2007;138(3):382-95.
45. Chen Z, Luo HY, Steinberg MH, Chui DH. BCL11A represses HBG transcription in K562 cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2009;42(2):144-9.
46. Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(5):1620-5.
47. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science.* 2008;322(5909):1839-42.

48. Chakalova L, Osborne CS, Dai YF, Goyenechea B, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis A, et al. The Corfu deltabeta thalassemia deletion disrupts gamma-globin gene silencing and reveals post-transcriptional regulation of HbF expression. *Blood*. 2005;105(5):2154-60.
49. Bauer DE, Orkin SH. Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies. *Curr Opin Pediatr*. 2011;23(1):1-8.
50. Sankaran VG, Xu J, Orkin SH. Transcriptional silencing of fetal hemoglobin by BCL11A. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1202:64-8.
51. Bauer DE, Kamran SC, Lessard S, Xu J, Fujiwara Y, Lin C, et al. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. *Science*. 2013;342(6155):253-7.
52. Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(27):11346-51.
53. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Hum Mol Genet*. 2009;18(R2):R216-23.
54. Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, Gutiérrez L, Grech G, Fanis P, et al. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet*. 2010;42(9):801-5.
55. Zhou D, Pawlik KM, Ren J, Sun CW, Townes TM. Differential binding of erythroid Kruppel-like factor to embryonic/fetal globin gene promoters during development. *J Biol Chem*. 2006;281(23):16052-7.
56. Donze D, Townes TM, Bieker JJ. Role of erythroid Kruppel-like factor in human gamma- to beta-globin gene switching. *J Biol Chem*. 1995;270(4):1955-9.
57. Chen X, Bieker JJ. Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) contains a multifunctional transcriptional activation domain important for inter- and intramolecular interactions. *EMBO J*. 1996;15(21):5888-96.
58. Möller M, Jöud M, Storry JR, Olsson ML. ErythroGene: a database for in-depth analysis of the extensive variation in 36 blood group systems in the 1000 Genomes Project. *Blood Adv*. 2016;1(3):240-9.
59. Liu D, Zhang X, Yu L, Cai R, Ma X, Zheng C, et al. KLF1 mutations are relatively more common in a thalassemia endemic region and ameliorate the severity of β -thalassemia. *Blood*. 2014;124(5):803-11.
60. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285-91.
61. Perkins A, Xu X, Higgs DR, Patrinos GP, Arnaud L, Bieker JJ, et al. Kruppeling erythropoiesis: an unexpected broad spectrum of human red blood cell disorders due to KLF1 variants. *Blood*. 2016;127(15):1856-62.
62. Fraser NS, Knauth CM, Moussa A, Dean MM, Hyland CA, Perkins AC, et al. Genetic Variants Within the Erythroid Transcription Factor, KLF1, and Reduction of the Expression of Lutheran and Other Blood Group Antigens: Review of the In(Lu) Phenotype. *Transfus Med Rev*. 2019;33(2):111-7.
63. Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat Genet*. 2010;42(9):742-4.
64. Radmilovic M, Zukic B, Petrovic MS, Bartsakoulia M, Stankovic B, Kotur N, et al. Functional analysis of a novel KLF1 gene promoter variation associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann Hematol*. 2013;92(1):53-8.
65. Tallack MR, Perkins AC. Three fingers on the switch: Kruppel-like factor 1 regulation of γ -globin to β -globin gene switching. *Curr Opin Hematol*. 2013;20(3):193-200.
66. Satta S, Perseu L, Moi P, Asunis I, Cabriolu A, Maccioni L, et al. Compound heterozygosity for KLF1 mutations associated with remarkable increase of fetal hemoglobin and red cell protoporphyrin. *Haematologica*. 2011;96(5):767-70.
67. Arnaud L, Saison C, Helias V, Lucien N, Steschenko D, Giarratana MC, et al. A dominant mutation in the gene encoding the erythroid transcription factor KLF1 causes a congenital dyserythropoietic anemia. *Am J Hum Genet*. 2010;87(5):721-7.
68. Giardine B, Borg J, Higgs DR, Peterson KR, Philipsen S, Maglott D, et al. Systematic documentation and analysis of human genetic variation in hemoglobinopathies using the microattribution approach. *Nat Genet*. 2011;43(4):295-301.
69. George E, Ann TJ. Genotype-phenotype diversity of beta-thalassemia in Malaysia: treatment options and emerging therapies. *Med J Malaysia*. 2010;65(4):256-60.

70. dos Santos CO, Zhou S, Secolin R, Wang X, Cunha AF, Higgs DR, et al. Population analysis of the alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) gene identifies sequence variants that alter expression and function. *Am J Hematol.* 2008;83(2):103-8.
71. Bank A. AHSP: a novel hemoglobin helper. *J Clin Invest.* 2007;117(7):1746-9.
72. Lai MI, Jiang J, Silver N, Best S, Menzel S, Mijovic A, et al. Alpha-haemoglobin stabilising protein is a quantitative trait gene that modifies the phenotype of beta-thalassaemia. *Br J Haematol.* 2006;133(6):675-82.
73. R G, L P, N G, G S. AHSP expression in beta-thalassemia carriers with thalassemia intermedia phenotype. *Blood.* 2003;102(1881a).
74. Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Chinchang W, Sangkla P, Weiss MJ, Higgs DR. Evaluation of alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) as a genetic modifier in patients with beta thalassemia. *Blood.* 2004;103(9):3296-9.
75. Wang Z, Yu W, Li Y, Shang X, Zhang X, Xiong F, et al. Analysis of alpha-hemoglobin-stabilizing protein (AHSP) gene as a genetic modifier to the phenotype of beta-thalassemia in Southern China. *Blood Cells Mol Dis.* 2010;45(2):128-32.
76. Ginder GD. Epigenetic regulation of fetal globin gene expression in adult erythroid cells. *Transl Res.* 2015;165(1):115-25.
77. van Dijk TB, Gillemans N, Pourfarzad F, van Lom K, von Lindern M, Grosveld F, et al. Fetal globin expression is regulated by Friend of Prmt1. *Blood.* 2010;116(20):4349-52.
78. Baronciani D, Angelucci E, Potschger U, Gaziev J, Yesilipek A, Zecca M, et al. Hemopoietic stem cell transplantation in thalassemia: a report from the European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation Hemoglobinopathy Registry, 2000-2010. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(4):536-41.
79. Cao A, Moi P, Galanello R. Recent advances in β -thalassemias. *Pediatr Rep.* 2011;3(2):e17.
80. Brendel C, Williams DA. Current and future gene therapies for hemoglobinopathies. *Curr Opin Hematol.* 2020;27(3):149-54.
81. Soni S. Gene therapies for transfusion dependent β -thalassemia: Current status and critical criteria for success. *Am J Hematol.* 2020;95(9):1099-112.
82. Nienhuis AW, Persons DA. Development of gene therapy for thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(11).
83. Temple GF, Dozy AM, Roy KL, Kan YW. Construction of a functional human suppressor tRNA gene: an approach to gene therapy for beta-thalassaemia. *Nature.* 1982;296(5857):537-40.
84. Lan N, Howrey RP, Lee SW, Smith CA, Sullenger BA. Ribozyme-mediated repair of sickle beta-globin mRNAs in erythrocyte precursors. *Science.* 1998;280(5369):1593-6.
85. Weatherall DJ. Gene therapy: repairing haemoglobin disorders with ribozymes. *Curr Biol.* 1998;8(19):R696-8.
86. Chandrakasan S, Malik P. Gene therapy for hemoglobinopathies: the state of the field and the future. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014;28(2):199-216.
87. Raja JV, Rachchh MA, Gokani RH. Recent advances in gene therapy for thalassemia. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4(3):194-201.
88. Nienhuis AW. Development of gene therapy for blood disorders: an update. *Blood.* 2013;122(9):1556-64.
89. Malik P, Arumugam PI. Gene Therapy for beta-thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005:45-50.
90. Cavazzana M, Mavilio F. Gene Therapy for Hemoglobinopathies. *Hum Gene Ther.* 2018;29(10):1106-13.
91. Dong A, Rivella S, Breda L. Gene therapy for hemoglobinopathies: progress and challenges. *Transl Res.* 2013;161(4):293-306.
92. Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, Rasko JEJ, Ribeil JA, Hongeng S, et al. Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *N Engl J Med.* 2018;378(16):1479-93.
93. Negre O, Eggimann AV, Beuzard Y, Ribeil JA, Bourget P, Borwornpinyo S, et al. Gene Therapy of the β -Hemoglobinopathies by Lentiviral Transfer of the β (A(T87Q))-Globin Gene. *Hum Gene Ther.* 2016;27(2):148-65.
94. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339(6121):823-6.
95. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature.* 2010;467(7313):318-22.

96. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007;318(5858):1920-3.



IMPRESUM

Trendovi u molekularnoj biologiji, 2022.

Izdavač

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

Urednik

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

Uređivački odbor

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 izlaženja publikacije

Godišnje

Tiraž

100 primeraka

Autori

Aleksandar Cingel.....	238
Ana Branković.....	63
Ana Djordjević.....	63
Branislava Medić Brkić.....	15
Dragana Srebro.....	15
Dunja Drakulić.....	168
Dusan Keckarević.....	51, 275
Goran Brajušković.....	63
Gordana Matić.....	8
Ilona Đorić.....	75
Ivana Guševac Stojanović.....	168
Jelena Martinović.....	186
Jelena Perić.....	143
Jovana Despotović.....	90
Katarina Savić Vujović.....	15
Katarina Zeljić.....	223
Mariana Stanišić.....	255
Marijana B. Živković.....	104
Marina Zarić Kontić.....	186
Milena Trajković.....	238
Milena Ugrin.....	32
Milica Keckarević Marković.....	51, 275
Milica Popović.....	63
Miljana Kecmanović.....	51, 275
Neda Đorđević.....	206
Nevena Banjac.....	223
Nikola Jovanović.....	125
Predrag Vujović.....	155
Sladjana Jevremović.....	238
Slavica Ninković.....	223
Sonja Šelemetjev.....	75
Sonja Vučković.....	15
Suzana Matijašević-Joković.....	63
Tamara Dakić.....	155
Tatjana Mitrović.....	125
Tijana Išić Denčić.....	75
Zorana Dobrijević.....	63

CIP - Каталогизacija u publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

577.2

TRENDOVI u molekularnoj biologiji = Trends in
Molecular Biology. - 2022, br. 2 (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