

*Aktuelne teme /  
Current topics*

OSNOVNI PRINCIPI EDITOVANJA GENOMA  
U BIOMEDICINI  
BASIC PRINCIPLES OF GENOME EDITING  
IN BIOMEDICINE

**Correspondence to:**

**Marko Dević**

Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet; Klinika za otorinolaringologiju i hirurgiju glave i vrata, Univerzitetski klinički centar Vojvodine, Novi Sad, Srbija  
Hajduk Veljkova 3, 21000, Novi Sad  
e-mail: marko.devic@mf.uns.ac.rs

Marko Dević<sup>1,2</sup>, Milica Pisarić<sup>1,2</sup>, Tamara Zelenović<sup>1,2</sup>, Dušan Zbućnović<sup>2</sup>, Bojan Stanimirov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

<sup>2</sup> Klinika za otorinolaringologiju i hirurgiju glave i vrata, Univerzitetski klinički centar Vojvodine, Novi Sad, Srbija

<sup>3</sup> Katedra za biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

**Ključne reči**

CRISPR, editovanje genoma, genska terapija, personalizovana medicina

**Key words**

CRISPR, genome editing, genetic therapy, personalized medicine

**Sažetak**

Editovanje genoma je koncept koji se razvija već decenijama, a smatra se jednim od najvažnijih dostignuća savremene nauke, sa potencijalom da unapredi personalizovanu medicinu. Među različitim metodama, CRISPR-Cas tehnologija se ističe zbog svoje efikasnosti i preciznosti, što je čini posebno značajnom za primenu u biomedicini. Cilj ovog rada bio je da se ukratko objasne osnovne editovanja genoma, s posebnim osvrtom na CRISPR-Cas sistem. Ova tehnologija pokazuje veliki potencijal za primenu u biomedicini, posebno u terapiji genetskih oboljenja. Njene prednosti, poput jednostavnosti korišćenja i visokog stepena specifičnosti, čine je ključnim alatom u savremenim istraživanjima. Ipak, uprkos obećavajućim rezultatima, još uvek postoje brojni izazovi koji sprečavaju njenu širu primenu. Pored tehničkih ograničenja, otvorena su i etička i pravna pitanja koja zahtevaju dodatna istraživanja i regulativne okvire.

**UVOD**

Smatra se da je proces evolucije odgovoran što je ljudska vrsta postigla takav stepen superiornosti u odnosu na druge vrste živog sveta. Kanali kroz koje je delovala prirodna selekcija ogledaju se uglavnom u promenama genoma koje su uslovile nastanak novih ili gubitak ranije stečenih funkcija. Nažalost nisu sve mutacije doprinele pozitivnom razvoju ljudske vrste <sup>(1)</sup>. Osnovni uzrok velike grupe bolesti – genetskih bolesti, leži u promenama nuklearnog ili mitohondrijalnog genoma koje dovode do brojnih, složenih i potencijalno fatalnih promena, koje za posledicu mogu imati nastanak teških oboljenja koja mogu da se završe smrtnim ishodom u ranom periodu života, poremećajima psihičkog i fizičkog razvoja i još mnogim stanjima koja opterećuju pojedinca, porodicu, kao i zdravstveni i ekonomski sistem jedne zemlje <sup>(2,3)</sup>. Da bi se u potpunosti razumeli molekularni mehanizmi koji su odgovorni za nastanak anomalija uzrokovanih genetskim poremećajima potrebni su odgovarajući molekularni i genetski alati.

Precizne manipulacije ćelijskim DNA sekvencama postaju stvarnost otkrićem editovanja genoma (gena). Na taj način mogu da se izmene sudbine ćelija i stanje organizma, što pruža mogućnost da se detaljnije razumeju genetske

bolesti i razviju strategije za tretman istih <sup>(4)</sup>. Primena genetskog inženjeringa može da dovede do pojačavanja ili smanjenja funkcije pojedinih gena, nadoknade gena kod određenih genetskih bolesti i povećavanja osetljivosti ćelija i mikroorganizama na određene hemioterapeutike. Takođe genetski inženjering pronalazi primenu u modifikovanju biljnih vrsta koje su otpornije na razne faktore okoline, sa boljim prinosem, ili pak sa smanjenim potencijalom indukovanja alergijskih reakcija što sve zajedno utiče na poboljšanje bezbednosti hrane koja se konzumira <sup>(5)</sup>.

*Principi editovanja genoma i razvoj metodologije editovanja genoma*

Jedan od potencijalnih pristupa na kojem se zasniva editovanje genoma je izazivanje prekida dvolančane DNA (*double-stranded breaks*, DSBs). Ukoliko se DSBs ne repariraju ili akumuliraju genomska nestabilnost indukuje programiranu ćelijsku smrt. U normalnim okolnostima, pojavom DSBs aktiviraju se brojni molekularni mehanizmi za reparaciju oštećenja u strukturi DNA od kojih su dva glavna: homologna rekombinacija (*homologous recombination*, HR) ili nehomologno spajanje krajeva (*non-homologous end-joining*, NHEJ). Oba načina popravke su spasonosna za ćeliju, ali između njih postoje brojne razlike, prvenstveno

što je NHEJ znatno češći scenario (6, 7). U procesu HR kao matrica se koristi DNA neoštećene sestrinske hromatide ili strana, egzogena DNA. Značaj HR je prepoznat u karcinogenezi mnogih tumora, od kojih je svakako najpoznatiji nasledni karcinom jajnika i adenokarcinom dojki i njegova povezanost sa defektnim *BRCA1* i *BRCA2* genima koji su uključeni u proces HR (8). Za razliku od HR, kod NHEJ nije potrebna matrica i jednostavniji je proces, ali je podložniji nastanku greške. U NHEJ reparatorni proteini mogu da ligiraju krajeve lanaca ili da dejstvom polimeraza i nukleaza ubace ili eliminišu određene nukleotide. Usled velike zastupljenosti NHEJ u popravci DSBs postoji mogućnost nastanka novih mutacija, koje mogu, ali i ne moraju imati posledice. I jedan i drugi proces dovode do ponovnog uspostavljanja strukturnog integriteta DNA, ali u slučaju NHEJ novonastala sekvenca često ne odgovara originalnoj(9).

Počeci editovanja genoma sežu do sedamdesetih godina prošlog veka kada su otkriveni restriktivni enzimi u bakterijskim ćelijama koji ih štite od invazije bakteriofaga (10). Restriktivni enzimi su po prvi put do tada omogućili da se vrše manipulacije sa DNA i redosledom baza unutar lanaca u prokariotskim ćelijama što je dalo nadu da će isto jednog dana biti moguće i u humanim ćelijama. Bilo je potrebno oko dvadeset godina da taj san postane java primenom enzima meganukleaza u eukariotskim ćelijama čime je započeto trasiranje puta ka ciljanim izmenama gena. Meganukleaze su endodeoksiribonukleaze koje se normalno javljaju unutar svih formi mikroorganizama, kao i unutar mitohondrija i hloroplasta eukariotskih ćelija. Njihov mehanizam dejstva zasniva se na sposobnosti da prepoznaju i isecaju određene dvolančane DNA sekvence (*double-stranded DNA*, dsDNA). Sekvence su obično duže od 14 baznih parova što varira u zavisnosti od meganukleaze koja učestvuje u njihovom cepanju (11, 12). Glavna razlika meganukleaza u odnosu na restriktivne enzime je u tome što olakšavaju mobilnost genetskih elemenata unutar ćelije i konačno modifikaciju DNA. Različite meganukleaze imaju visoku specifičnost za određene ciljane sekvence i nekada nije moguće naći prirodno dostupnu meganukleazu koja može da se veže za deo DNA od interesa. Brojni istraživači su pokušali da modifikuju meganukleaze kako bi izmenili njihovu specifičnost, ali do sada nije postignut zadovoljavajući uspeh (13).

Potreba za otkrićem novih molekularnih alata koji bi pokazivali veću specifičnost i bili lakši za manipulaciju dovela je do razvoja sistema cink finger nukleaza (*zinc-finger nucleases*, ZFNs) i efektorskih nukleaza sličnih aktivatoru transkripcije (*transcription activator-like effector nucleases*, TALENs) (14). ZFNs predstavljaju kompleks sastavljen iz dva domena. Prvi domen, koji čine cink finger proteini, omogućuje vezivanje ZFNs za određeni deo DNA, dok drugi domen čine endonukleaze kao što je npr. FokI (*Flavobacterium okeanokoites*) endonukleaza koja dovodi do DSBs. Izmenom redosleda aminokiselina nekatalitičkog dela moguće je kreirati molekularne alate koji bi se vezivali za tačno određenu sekvencu DNA od interesa (15). Svaki ZFNs kompleks prepoznaje deo lanca DNA dužine preko tri bazna para, pa bi spajanjem više ZFNs u velike komplekse mogla da se poveća specifičnost vezivanja za određenu sekvencu DNA. Da bi nukleaze ispoljile svoje katalitičko

dejstvo neophodna je dimerizacija FokI dva odvojena ZFNs sistema koja se vezuju za suprotne lance ciljnog segmenta DNA. Jedan od nedostataka ZFNs je mogućnost izmene gena koji nisu meta (*off target*), što može dovesti do raznih neželjenih događaja. Pored toga, s obzirom da je veza unutar dimera često slaba da bi se postigla željena funkcija, da za neke sekvence zbog specifičnosti ZFNs nije moguće kreirati odgovarajući kompleks, kao i da je sve to postupak koji zahteva vreme, iako su ZFNs pronašli svoju primenu u genskom inženjeringu, potraga za savršnijim načinima za manipulaciju genomom se i dalje nastavlja (16).

TALENs svojom strukturom podsećaju na ZFNs tako što nastaju fuzijom domena koji služi za vezivanje i drugog domena koji poseduje endonukleaznu aktivnost, pri čemu se najčešće koristi FokI nukleaza. Vezujući domen TALENs je prvobitno izolovan iz *Xanthomonas* proteobakterija i sastoji se iz više monomera od kojih se svaki od njih vezuje za jedan nukleotid unutar ciljane sekvence. TALENs predstavljaju superiorniji vid modifikacije genoma u odnosu na ZFNs pošto je lakše konstruisati kompleks sa većom specifičnošću za određeni deo lanca DNA. Međutim, i kod TALENs je glavni nedostatak mogućnost stvaranja mutacija u genima koji nisu od interesa (17, 18).

#### *CRISPR-Cas sistem*

Grupisano, redovno razmaknuto kratko palindromsko ponavljanje (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeat*, CRISPR) danas predstavlja najsofisticiraniji pristup u editovanju genoma. Prvi susret istraživača sa CRISPR bio je 1987. godine prilikom proučavanja genoma bakterije *Escherichia coli* kada je uočeno postojanje neobične repetitivne DNA sekvence. Međutim, prave razmere ovog otkrića ostaće neprepoznate sve do početka 21. veka i razvoja adekvatnih metoda koje će znatno proširiti vidike vezano za primenu CRISPR u molekularnim istraživanjima (19). Nekoliko godina nakon otkrića ove sekvence u genomu bakterija, ista sekvenca identifikovana je i u genomu *Arhea*. Unutar genoma prokariota CRISPR sekvence su komplementarne sa pojedinim stranim DNA sekvencama kao što je na primer DNA bakteriofaga. Iz toga daljim ispitivanjima je zaključeno da CRISPR ima ulogu u adaptivnom imunom odgovoru prokariota. Naime, kada ćeliju inficira virus čija DNA je komplementarna sekvencama u genomu prokariota, bakterijska DNA će se vezivati za stranu DNA i pomoću nukleaze Cas (*CRISPR-associated genes*, Cas) razgraditi stranu DNA (20).

Poznato je da postoje tri glavna tipa CRISPR/Cas sistema sa svojim podtipovima, pri čemu je tip II kao najviše istražen našao najširu primenu u editovanju genoma (21). Kod tipa II glavna nukleaza je Cas9 koja se vezuje za ciljnu sekvencu DNA pomoću RNA vodeće sekvence koju čine CRISPR RNA (crRNA) i trans-aktivirajuća crRNA (tracrRNA). Ove dve komponente mogu međusobno da reaguju i da kreiraju crRNA-tracrRNA dupleks koji se naziva vodeća RNA (*guide RNA*, gRNA). Kompleks vodeće RNA može da bude zamenjen jednom vodećom RNA (*single guide RNA*, sgRNA) što dodatno pojednostavljuje CRISPR/Cas9 sistem i nema uticaja na njegovu efikasnost (22). Od dupleks sistema sgRNA se razlikuje po tome što se na 5' kraju nalazi sekvenca koja služi za vezivanje za tačno određen deo lanca DNA preko uparivanja baza, dok 3' kraj

služi za ostvarivanje veze sa Cas9. Izmenom sekvence na 5' kraju može se kreirati sistem koji će se vezivati za tačno određen deo lanca DNA. Da bi se ostvarila adekvatna veza neophodno je da u ciljnoj DNA postoji *protospacer* sekvence za koju će se vezati 5' kraj sgRNA (ili gRNA) i prisustvo tačno određene sekvence koja se naziva PAM (*protospacer adjacent motif*) za koju se vezuje Cas9. Veliki značaj PAM se ogleda u činjenici da u odsustvu istog može da se desi da i pored postojanja sekvence koja je komplementarna sgRNA Cas9 ne prepozna sekvencu od interesa (23). Dakle, neophodno je da oba navedena uslova budu ispunjena kako bi Cas9 mogla da dovede do DSBs na tačno određenom delu DNA. Kao što je ranije opisano, nakon nastanka DSBs aktiviraju se mehanizmi za reparaciju DNA, pa tako korišćenjem CRISPR/Cas9 sistema i indukcijom NHEJ ili HR mogu da se izbrišu, zamene ili dodaju određene genske sekvence (24).

Kao i kod ostalih metoda genetskog inženjeringa i u slučaju CRISPR/Cas9 postoji mogućnost nastanka *off target* mutacija. Da bi se to prevazišlo selektivnom inhibicijom ključnih enzima NHEJ moguće je poboljšati efikasnost HR (25). Još jedan izazov je smanjenje verovatnoće *off target* mutacija kreiranjem specifičnih tipova Cas9 nazvanih *nickase* (Cas9n) koji bi doveli do nastanka prekida samo jednog lanca DNA i posledične popravke drugačijim putevima kao što je npr. popravka isečene baze (*base excision repair*, BER) (26).

#### Alternativna primena CRISPR/Cas9 sistema

##### Epigenetska regulacija

Termin epigenetika se odnosi na nasledne promene ekspresije gena koje nisu izazvane izmenama DNA sekvence. Epigenetski mehanizmi obuhvataju DNA metilaciju i demetilaciju, posttranslacione modifikacije histona, pozicioniranje nukleozoma i modifikacije posredstvom nekodirajuće RNA. Navedeni mehanizmi pojedinačno ili zajedno učestvuju u etiopatogenezi malignih bolesti, defekata imprintinga i određenih naslednih bolesti (27). Epigenetska regulacija primenom CRISPR/Cas9 sistema se odnosi na aktivaciju ili inhibiciju specifičnih genetskih sekvenci bez izazivanja izmena u genomu. Da bi navedeno bilo moguće koristi se posebna vrsta Cas9, tzv. endonukleaza deficijentna Cas9 (dCas9), koja nema katalitičku aktivnost, ali zadržava sposobnost da se vezuje za specifičnu sekvencu DNA. Princip epigenetske regulacije pomoću CRISPR/Cas9 sistema jeste spajanje dCas9 sa domenima koji mogu da deluju kao aktivatori ili supresori transkripcije preko modulacije određenih epigenetskih mehanizama (28).

Regulacija ekspresije gena na nivou transkripcije

Ciljanjem određenih sekvenci DNA pomoću dCas9 moguće je delovati na transkripciju gena. Aktivacija gena (CRISPRa) se može postići vezivanjem dCas9 za transkripcioni aktivirajući domen, dok se genska represija (CRISPRi) može postići izazivanjem brojnih procesa koji konačno preveniraju inicijaciju, elongaciju ili terminaciju transkripcije RNA (29).

##### Izmena baza

Izmena baze je vrsta genetskog inženjeringa u kojoj se izaziva ireverzibilna konverzija jednog baznog para u određenom genskom lokusu bez potrebe za raskidanjem

lanca DNA (30). I u ovom slučaju koristi se dCas9 uparena sa enzimom koji služi za modifikaciju jednog lanca DNA. Postoje dve kategorije enzima za izmenu jednog lanca DNA: bazni editori citozina (*cytosine base editors*, CBE) i bazni editori adenozina (*adenosine base editors*, ABE), pa je moguće izazvati 4 vrste promena (C→T, T→C, G→A i A→G). Na ovaj način postoji mogućnost da se ispravi oko 25% humanih patogenih promena koje su uslovljene polimorfizmom jednog nukleotida (31).

##### Prime editing

Primenom prime editinga moguće je izazvati svih 12 promena iz baze u bazu bez prisustva donorske DNA zato što se prime editing ne zasniva na izazivanju DSBs. Princip na kom se zasniva prime editing je postojanje prime editing vodeće RNA (*prime editing guide RNA*, pegRNA) i nCas9 fuzionisane sa reverznom transkriptazom (nCas9-RT). Reverzna transkriptaza je RNA-zavisna-DNA polimeraza koja koristi sekvencu iz pegRNA kao matricu. Postoje tri sistema prime editinga za primenu u humanim ćelijama koji se razlikuju u termostabilnosti, procesivnosti, afinitetu, aktivnosti i mnogim drugim osobinama. Kao posledica svega toga razlikuje se i njihova uspešnost (32).

##### Pristupi u aplikaciji CRISPR/Cas9 tehnologije

Mnoge bolesti koje su uslovljene određenim genetskim mutacijama su trenutno neizlečive i njihov tretman se svodi na produžavanje života i pružanje palijativnih mera. Editovanje genoma daje nadu da će izlečenje velikog broja genetskih bolesti, ali i mnogih drugih kao što su maligne bolesti, HIV infekcija, degenerativne bolesti i druge, biti moguće. Postoji više ideja, a samim tim i pristupa na koji način i u kom tipu ćelija se editovanjem genoma može uticati na tok i ishod bolesti (33). Jedan od pristupa je *ex vivo* gde se modifikacija genoma vrši u ćelijama van organizma nakon čega se izmenjene ćelije transplantiraju nazad u organizam. Drugi pristup je modifikovanje genoma *in vivo* gde se izmene genoma vrše u ćelijama koje su unutar organizma, što zahteva adekvatan način dopremanja CRISPR/Cas9 sistema, što će kasnije biti detaljnije objašnjeno. Treći pristup je *in vitro* koji je rezervisan za ispitivanja van organizma (34). Ukoliko se načine modifikacije genoma unutar somatskih ćelija organizma neće doći do izmena u narednim generacijama. Međutim, editovanje genoma gameta ili zigota dovodi do izmena naslednog materijala unutar svih ćelija organizma koji se razvija iz tog zigota. Na ovaj način nastaju promene koje se mogu prenositi u naredne generacije, što daje nadu da će biti moguće iskoreniti bolesti koje pogađaju sve članove porodice (35).

CRISPR/Cas9 sistemi koji se koriste u istraživanjima na humanim ćelijama vode poreklo iz prokariotskih ćelija. Prvi adaptirani sistem su 2012. godine izolovale Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier iz bakterije *Streptococcus Pyogenes*, koji je po bakteriji nazvan SpyCas9 (36). Ovo otkriće izazvalo je veliko interesovanje naučne zajednice što je dovelo do izolovanja sistema i iz nekih drugih bakterija kao što su SaCas9 (*Staphylococcus aureus*) (37), NmCas9 (*Neisseria meningitidis*) (38), FnCas9 (*Francisella novicida*) (39) i mnogi drugi. Svaki od njih se vezuje za različite PAM i ima različitu aktivnost, što treba uzeti u obzir prilikom kreiranja specifičnih sistema za modifikaciju gena.

Naredni veliki izazov u editovanju genoma predstavlja način uvođenja CRISPR/Cas9 sistema u ćeliju i koji nosač koristiti. Postoje tri glavne kategorije nosača sistema: (1) DNA plazmid koji kodira i Cas9 protein i gRNA, (2) mRNA za Cas9 protein i odvojena gRNA i (3) Cas9 protein sa gRNA (ribonukleoproteinski kompleks). Često će izbor nosača zavisi od njegove kompatibilnosti sa načinom insercije u ćeliju ili u zavisnosti od toga da li se radi o *in vivo*, *in vitro* ili *ex vivo* pristupu (40).

Načini uvođenja CRISPR/Cas9 sistema u ćeliju mogu da se podele u tri kategorije: fizičke metode, metode primene virusnih i ne-virusnih vektora. Svaku metodu karakterišu prednosti i nedostaci koji uslovljavaju i ograničavaju njihovo mesto u editovanju genoma. Tipični predstavnici fizičkih metoda su mikroinjektovanje i elektroporacija.

Mikroinjektovanje predstavlja direktno ubacivanje nosača u ćeliju pomoću mikroskopa i igle dijametra 0,5-5 µm. Zbog toga što zaobilazi brojne barijere u vezi sa ekstracelularnim matriksom i prolazom materija kroz ćelijske membrane i citoplazmatske komponente, mikroinjektovanje ima efikasnost isporuke od gotovo 100%. Međutim, primena ove metode zahteva visokospecijalizovane laboratorije i obučeno osoblje, a zbog specifičnosti izvođenja *in vivo* primena nije trenutno moguća, ali je pogodna u *ex vivo* ili *in vitro* pristupu (41).

Elektroporacija se zasniva na korišćenju visoko-voltažnih električnih pulseva što dovodi do prolaznog otvaranja nanometarskih pora u ćelijskoj membrani kroz koje komponente CRISPR/Cas9 sistema mogu da uđu u ćeliju. Potrebno je napraviti selekciju ćelija koje su otpornije na stresogene faktore, zato što visoko-voltažni električni pulsevi mogu da dovedu do smrti osetljivih ćelija. Za razliku od mikroinjekcije, elektroporacija bi mogla da se primeni i u *in vivo* uslovima (42).

Kao virusni vektori najviše su ispitivani adenovirusi (AV), lentivirusi (LV) i adeno-asocirani virusni vektor (AAV). Virusni vektori su pogodni za primenu *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. Za razliku od LV i AV do sada nije dokazano da AAV izaziva bolest kod ljudi. Pored toga, postoji mnogo serotipova AAV, tako da ukoliko se razvije imunski odgovor na neki od njih, može se lako naći zamena. Veliko ograničenje virusnih vektora jeste njihova veličina, tj. mora se pažljivo odabrati pogodan virusni nosač u koji mogu da se upakuju komponente sistema (40).

Ne-virusni vektori podrazumevaju pakovanje komponenti CRISPR/Cas9 sistema u razne prirodne ili sintetičke vektore kao što su na primer lipidne nanopartikule (lipozomi), peptidi koji penetriraju ćeliju, nanopartikule zlata i mnoge druge. Ove metode su takođe pogodne za *in vivo*, *in vitro* i *ex vivo* primenu, a zasnovane su na sposobnosti nosača da posreduju u transportu komponenti CRISPR/Cas9 sistema kroz ćelijske membrane, kao i da ga dopreme u stabilnom obliku do ciljnih ćelija (40).

#### *Etičke dileme u vezi sa editovanjem genoma*

Rastući broj novih metoda genetskog inženjeringa otvara nam mogućnost potencijalne primene u lečenju mnogih za sada neizlečivih oboljenja, ali istovremeno predstavlja i velike izazove za modernu nauku i pravo (43). Prednosti CRISPR tehnologije nisu upitne, već potencijalna zloupo-

treba s obzirom da još uvek ne postoji jedinstveni regulatorni okvir. O socijalnim, pravnim i etičkim implikacijama genetske modifikacije vođene su rasprave još sedamdesetih godina prošlog veka, kada se prvi put i javila ideja o potencijalnim benefitima i mogućnostima genetske terapije (44). Prva zemlja koja je, u nekom obliku, dozvolila manipulaciju humanim genetskim materijalom je Velika Britanija koja je 2015. godine dozvolila primenu tehnologije zamene mitohondrija. Ova tehnologija je razvijena u cilju da se prekinu niz oboljevanja u porodicama od bolesti koje su uzrokovane mutacijama u mitohondrijalnom genetskom materiju tako što će primenom određenih metoda biti kreiran zigot sa donorskim, zdravim mitohondrijama (45). U svetu je do danas odobren tek mali broj genetskih terapija čiji se efekti i dalje prate i redovno evaluiraju (46). Ukoliko se pokaže da su rezultati dobijeni tehnologijom CRISPR/Cas9 naučno utemeljeni i validni, sigurno je pomisliti da nam u skorijoj budućnosti predstoje značajne promene u prevenciji, dijagnostici i lečenju raznih bolesti primenom genetske modifikacije (47). Naročitu pažnju bi trebalo posvetiti zaštiti ljudi koji učestvuju u istraživanju, što često može da podrazumeva preminule osobe ili pripadnike vulnerabilnih populacija kao što su na primer deca (48). Zbog toga neophodno je blagovremeno urediti pravna, socijalna i etička pitanja u vezi sa tako kompleksnim postupkom kao što je editovanje humanog genoma.

#### **ZAKLJUČAK**

Otkriće CRISPR/Cas9 sistema predstavlja jedno od najznačajnijih otkrića u oblasti editovanja genoma. O tome koliki je značaj ove tehnologije govori činjenica da su naučnice najzaslužnije za njegovu populaciju (Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier) 2020. godine dobile Nobelovu nagradu za hemiju. Nema sumnje da će nas genetski inženjering znatno približiti potpuno personalizovanoj medicini, ali postoji mnogo nejasnoća i tehničkih pitanja na koja treba dati odgovor. Neophodno je dalje ispitati kratkoročne i dugoročne efekte primene na žive organizme i njihovo potomstvo. Dalje rasprave na globalnom nivou su potrebne da se uobličiti i razmotri postojeća regulatorna i etička politika kako bi se adekvatno odvijao dalji razvoj editovanja genoma primenom CRISPR-Cas sistema.

## Abstract

Genome editing is a concept that has been developing for decades and is considered one of the most significant achievements of modern science, with the potential to advance personalized medicine. Among various methods, the CRISPR-Cas technology stands out due to its efficiency and precision, making it particularly important for biomedical applications. The aim of this paper was to briefly explain the fundamentals of genome editing, with a special focus on the CRISPR-Cas system. This technology shows great potential for biomedical applications, especially in the treatment of genetic disorders. Its advantages, such as ease of use and high specificity, make it a key tool in contemporary research. However, despite promising results, numerous challenges still hinder its widespread application. In addition to technical limitations, ethical and legal issues remain open, requiring further research and regulatory frameworks.

## LITERATURA

- Dawkins HJS, Draghia-Akli R, Lasko P, Lau LPL, Jonker AH, Cutillo CM, et al. Progress in Rare Diseases Research 2010–2016: An IRDiRC Perspective. *Clin Transl Sci*. 2018;11(1):11-20.
- Matuszewska KE, Bukowska-Olech E, Piechota M, Staniek-Lacna K, Drews K, Więckowska B, et al. From chromosomal aberrations to mutations in individual genes - the significance of genetic studies of chorions after miscarriage in the search for causes of miscarriages. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2024;37(1):2364249. doi:10.1080/14767058.2024.2364249
- Roth TL, Marson A. Genetic Disease and Therapy. *Annu Rev Pathol*. 2021;16:145–66.
- Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*. 2020;578(7794):229–36.
- Zhang Y, Iaffaldano B, Qi Y. CRISPR ribonucleoprotein-mediated genetic engineering in plants. *Plant Commun*. 2021;2(2):100168. doi:10.1016/j.xplc.2021.100168
- Liao H, Wu J, VanDusen NJ, Li Y, Zheng Y. CRISPR-Cas9-mediated homology-directed repair for precise gene editing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2024;35(4):102344. doi:10.1016/j.omtn.2024.102344
- Huang S, Yan Y, Su F, Huang X, Xia D, Jiang X, et al. Research progress in gene editing technology. *Front Biosci*. 2021;26(10):916–27.
- Fiegl H, Schnaiter S, Reimer DU, Leitner K, Nardelli P, Tsibulak I, et al. BRCA loss of function including BRCA1 DNA-methylation, but not BRCA-unrelated homologous recombination deficiency, is associated with platinum hypersensitivity in high-grade ovarian cancer. *Clin Epigenetics*. 2024;16(1):171. doi:10.1186/s13148-024-01781-0
- Zhao B, Rothenberg E, Ramsden DA, Lieber MR. The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(12):765–781.
- Yang N, Wang R, Zhao Y. Revolutionize Genetic Studies and Crop Improvement with High-Throughput and Genome-Scale CRISPR/Cas9 Gene Editing Technology. *Mol Plant*. 2017;10(9):1141–3.
- Li C, Brant E, Budak H, Zhang B. CRISPR/Cas: a Nobel Prize award-winning precise genome editing technology for gene therapy and crop improvement. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2021;22(4):253–84.
- Tröder SE, Zevnik B. History of genome editing: From meganucleases to CRISPR. *Lab Anim*. 2022;56(1):60-68. doi:10.1177/0023677221994613
- Khalil AM. The genome editing revolution: review. *J Genet Eng Biotechnol*. 2020;18(1):68. doi:10.1186/s43141-020-00078-y.
- Tamura R, Toda M. Historic Overview of Genetic Engineering Technologies for Human Gene Therapy. *Neurol Med Chir*. 2020;60(10):483–91.
- Ho BX, Loh SJH, Chan WK, Soh BS. In Vivo Genome Editing as a Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2721. doi:10.3390/ijms19092721.
- Katayama S, Watanabe M, Kato Y, Nomura W, Yamamoto T. Engineering of Zinc Finger Nucleases Through Structural Modeling Improves Genome Editing Efficiency in Cells. *Adv Sci*. 2024;11(23):e2310255. doi:10.1002/advs.202310255
- Zhang HX, Zhang Y, Yin H. Genome Editing with mRNA Encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Mol Ther*. 2019;27(4):735–46.
- Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, Krzowski L, Saluk-Bijak J, Bijak M. Various Aspects of a Gene Editing System-CRISPR-Cas9. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):1–20.
- Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *J Bacteriol*. 2018;200(7):e00580-17. doi:10.1128/JB.00580-17.
- Zhang D, Zhang Z, Unver T, Zhang B. CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement. *J Adv Res*. 2020;29:207–21.
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096. doi:10.1126/science.1258096.
- Palermo G. Structure and Dynamics of the CRISPR-Cas9 Catalytic Complex. *J Chem Inf Model*. 2019;59(5):2394-2406. doi:10.1021/acs.jcim.8b00988
- Cui Y, Xu J, Cheng M, Liao X, Peng S. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools. *Interdiscip Sci*. 2018;10(2):455–65.
- De Masi C, Spitalieri P, Murdocca M, Novelli G, Sangiuolo F. Application of CRISPR/Cas9 to human-induced pluripotent stem cells: from gene editing to drug discovery. *Hum Genomics*. 2020;14(1):25. doi:10.1186/s40246-020-00276-2.
- Yang H, Ren S, Yu S, Pan H, Li T, Ge S, et al. Methods Favoring Homology-Directed Repair Choice in Response to CRISPR/Cas9 Induced-Double Strand Breaks. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):6461. doi:10.3390/ijms21186461
- Naeem M, Majeed S, Hoque MZ, Ahmad I. Latest Developed Strategies to Minimize the Off-Target Effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing. *Cells*. 2020;9(7):1608. doi:10.3390/cells9071608.
- Glavaski M, Stankov K. Epigenetics in disease etiopathogenesis. *Genetika*. 2019;51(3):975–94.
- Khosravi S, Hinrichs R, Rönspies M, Haghi R, Puchta H, Houben A. Epigenetic state and gene expression remain stable after CRISPR/Cas-mediated chromosomal inversions. *New Phytol*. 2025 Jan 29. doi:10.1111/nph.20403. Epub ahead of print. PMID: 39878102.
- Sharma G, Sharma AR, Bhattacharya M, Lee SS, Chakraborty C. CRISPR-Cas9: A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of Human Diseases. *Mol Ther*. 2021;29(2):571-86.
- Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*. 2018;361(6405):866–9.
- Kantor A, McClements ME, Maclaren RE. CRISPR-Cas9 DNA Base-Editing and Prime-Editing. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):1–22.
- Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, Baral R, Barrera LA, Bounoutas GS, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med*. 2019;25(2):229–33.

33. Foss D V., Hochstrasser ML, Wilson RC. Clinical applications of CRISPR-based genome editing and diagnostics. *Transfusion*. 2019;59(4):1389–99.
34. Memi F, Ntokou A, Papangeli I. CRISPR/Cas9 gene-editing: Research technologies, clinical applications and ethical considerations. *Semin Perinatol*. 2018;42(8):487–500.
35. Savić N, Schwank G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Transl Res*. 2016;168:15–21.
36. 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.
37. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013;154(6):1380–9.
38. Hou Z, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu LF, Sontheimer EJ, et al. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(39):15644–9.
39. Hirano H, Gootenberg JS, Horii T, Abudayyeh OO, Kimura M, Hsu PD, et al. Structure and Engineering of Francisella novicida Cas9. *Cell*. 2016;164(5):950–61.
40. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv*. 2018;25(1):1234–57.
41. Wang HX, Li M, Lee CM, Chakraborty S, Kim HW, Bao G, et al. CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Disease Modeling and Therapy: Challenges and Opportunities for Nonviral Delivery. *Chem Rev*. 2017;117(15):9874–906.
42. Yip BH. Recent Advances in CRISPR/Cas9 Delivery Strategies. *Biomolecules*. 2020;10(6):839. doi: 10.3390/biom10060839.
43. Furrow B. The CRISPR-Cas9 Tool of Gene Editing: Cheaper, Faster, Riskier?. *Ann Health L*. 2017;26(2):32–51.
44. Aikyo T, Kogetsu A, Kato K. Stakeholder Involvement in the Governance of Human Genome Editing in Japan. *Asian Bioeth Rev*. 2023;1–25. <https://doi.org/10.1007/s41649-023-00251-8>.
45. Noohi F, Ravitsky V, Knoppers BM, Joly Y. Mitochondrial Replacement Therapy: In Whose Interests?. *J Law Med Ethics*. 2022;50(3):597–602.
46. Polcz S, Lewis A. CRISPR-Cas9 and the non-germline non-controversy. *J Law Biosci*. 2016;3(2):413–25.
47. Sovilj R, Stojković Zlatanović S. Pravne, socijalne i etičke implikacije editovanja humanog genoma primenom tehnologije CRISPR/Cas9. *Anali Pravnog fakulteta u Beogradu*. 2021;69(3):625–45.
48. Stankov K, Draskovic D, Mikov M. Ethical and legal aspects of oncogenomics. *J BUON*. 2012;17(2):383–8.