

# Terapijska primjena ciljane modifikacije genoma sljedeće generacije u djece

---

**Mohler, Iva**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:468205>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-28**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Iva Mohler**

**Terapijska primjena ciljane modifikacije genoma  
sljedeće generacije u djece**

**Diplomski rad**



**Zagreb, 2020.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom doc.dr.sc. Maria Ćuka, dr.med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2019./2020.

## Popis kratica

AAV- adeno-povezani virusi (engl. *adeno-associated viruses*)

Cas – CRISPR-povezani geni (engl. *CRISPR associated genes*)

Cin-del – CRISPR-inducirana delecija (engl. *CRISPR-Induced Deletion*)

cjCas9 –*Campylobacter jejuni* Cas9

CRISPR – grupirana redovito isprekidana kratka palindromska ponavljanja (engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)

crRNA- CRISPR RNA (engl. *CRISPR RNA*)

dCas9 -katalitički neaktivan Cas9 (engl. *catalytically inactive Cas9*)

DNA- deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

DSB - dvolančani lom DNA (engl. *double stranded break*)

ESE- pojačivač spajanja egzona (engl. *exonic splicing enhancer*)

ESS- prigušivač spajanja egzona (engl. *exonic splicing silencer*)

GVHD- bolest presatka protiv domaćina (engl. *graft versus host disease*)

HbA- adultni hemoglobin

HbF- fetalni hemoglobin

HDR- homologno-usmjeren popravak (engl. *homology-directed repair*)

HLA- humani leukocitni antigen (engl. *Human Leukocyte Antigens*)

HPFH- nasljedna perzistencija fetalnog hemoglobina (engl. *hereditary persistence of fetal globin*)

HSCT- transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (engl. *hematopoetic stem cell transplantation*)

indel- insercije i delecije

iPSC- inducirane pluripotentne matične stanice (engl. *induced pluripotent stem cells*)

ISS-N1- prigušivač spajanja introna-N1 (engl. *intronic splicing silencer-N1*)

mRNA – glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

nCas9- *nickase* Cas9

NHEJ – ne-homologno spajanje krajeva (engl. *non-homologous end joining*)

nmCas9 - *Neisseria meningitidis* Cas9

PAM – proto-razmaknici susjedan motiv (engl. *protospacer adjacent motif*)

pre-mRNA- pre-glasnička RNA (engl. *pre-messenger RNA*)

RNA- ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

saCas9- *Staphylococcus aureus* Cas9

sgRNA- RNA vodič (engl. *single guided RNA*)

SMN- opstali motorni neuron (engl. *survival motor neuron*)

SMN1- opstali motorni neuron 1 (engl. *survival motor neuron 1*)

spCas9- *Streptococcus pyogenes* Cas9

tracrRNA- trans-aktivirajuća CRISPR RNA (engl. *trans-activating CRISPR RNA*)

## Sažetak

Terapijska primjena ciljane modifikacije genoma sljedeće generacije u djece

Sustav CRISPR-Cas (engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) predstavlja prirodni imunitet prokariota koji omogućuje obranu od bakteriofaga. Nakon što bakteriofag inficira bakteriju po prvi puta, bakterija u svoj lokus CRISPR uvrsti dio pocijepane virusne DNA koji tijekom ponovne infekcije omogućuje prepoznavanje istog bakteriofaga i njegovo uklanjanje. Postoje brojne vrste sustava CRISPR-Cas od kojih se najčešće koristi CRISPR-Cas9. CRISPR-Cas9 pobudio je veliki interes znanstvenika kao alat za genetsku modifikaciju. Sastavljen je od dvije komponente: sgRNA (engl. *single guided RNA*) i endonukleaze Cas9 (*CRISPR associated 9*). SgRNA vodi endonukleazu Cas9 do njoj komplementarne sekvence gdje endonukleaza Cas9 cijepa dvolančanu DNA. Ciljno mjesto na DNA je komplementarno sa sgRNA. Programiranjem nukleotidnog slijeda sgRNA moguće je modificirati mnoge gene. Genetska modifikacija putem sustava CRISPR-Cas9 temelji se na induciranju loma dvolančane DNA posredovanog nukleazom Cas9 koji se potom popravljaju uz pomoć sustava za popravku DNA NHEJ (engl. *non-homologous end joining*) i HDR (engl. *homology-directed repair*). NHEJ je greškama podložan mehanizam popravka koji vodi nakupljanju insercija i delecija na mjestu popravka DNA. Za HDR je potreban predložak DNA koji se umeće na mjesto novonastalog loma. CRISPR-Cas9 se može koristiti za inserciju, deleciju i korekciju ciljnog gena. Klinička primjena sustava CRISPR-Cas mogla bi omogućiti liječenje genetskih bolesti uključujući Duchenneovu mišićnu distrofiju, spinalnu mišićnu atrofiju, anemiju srpastih stanica, te druge bolesti za koje su trenutno dostupne terapijske mogućnosti oskudne. Precizne, specifične i brze modifikacije gena posredovane sustavom CRISPR-Cas inovativne su terapijske opcije za liječenje nasljednih i drugih bolesti uzrokovanih poremetnjom genoma u bliskoj budućnosti.

**Ključne riječi:** CRISPR-Cas9, genetska modifikacija, Duchenneova mišićna distrofija, anemija srpastih stanica, spinalna mišićna atrofija

## **Summary**

### Therapeutic application of next-generation genome editing in children

The Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) system represents a congenital immunity of prokaryotes which enables their defense against phages. After the phage infects the bacteria for the first time, the bacteria integrates a part of a chopped viral DNA into its CRISPR locus which enables the recognition and removal of the same phage when the next infection occurs. There are many variants of the CRISPR-Cas system and the most frequently used one is the CRISPR-Cas9. CRISPR-Cas9 has piqued many scientists interest as a genetic modification tool. It is composed of two components; single guided RNA (sgRNA) and endonuclease Cas9 (CRISPR associated 9). SgRNA leads the endonuclease Cas9 to its complementary sequence where the sequence chops double stranded DNA. The target DNA location is complementary with sgRNA. SgRNA nucleotide sequence programming facilitates the modification of many genes. Genetic modification through CRISPR-Cas9 system is based on the breakdown induction of double stranded DNA, which is mediated by nuclease Cas9 which then repairs itself with the DNA repairing system non-homologous end joining (NHEJ) and homology-directed repair (HDR). NHEJ is error-prone system, which leads to accumulation of insertions and deletions in the repaired DNA region. A template of DNA is needed for HDR and is then inserted in the region that has been broken down. CRISPR-Cas9 can be used for insertion, deletion and correction of the targeted gene. The clinical use of the CRISPR-Cas system could enable the treatment of genetic diseases such as Duchenne muscular atrophy, spinal muscular atrophy, sickle cell anemia and other diseases that currently have very few therapeutic options. Precise, specific and quick genetic modifications interceded by the CRISPR-Cas system are innovative therapeutic options of the near future and could be used for the treatment of inheritable and other diseases caused by genome disturbance.

**Key words:** CRISPR-Cas9, genetic modification, Duchenne muscular dystrophy, sickle-cell anemia, spinal muscular atrophy

## Sadržaj

Sažetak .....	i
Summary .....	ii
1. UVOD .....	1
2. MEHANIZAM DJELOVANJA I VRSTE SUSTAVA CRISPR-Cas .....	3
3. CRISPR-Cas9 .....	6
4. MODIFIKACIJA GENA .....	7
5. OGRANIČENJA GENETSKE MODIFIKACIJE POMOĆU SUSTAVA CRISPR-Cas9 .....	12
6. VEKTORI ZA DOPREMANJE CRISPR-Cas9 U STANICE DOMAĆINA .....	14
7. TERAPIJSKA PRIMJENA CRISPR-Cas9 U PEDIJATRIJI .....	16
7.1 Duchenneova mišićna distrofija .....	16
7.2 Spinalna mišićna atrofija .....	18
7.3 Anemija srpastih stanica .....	20
ZAKLJUČAK .....	22
ZAHVALE .....	23
LITERATURA .....	24
ŽIVOTOPIS .....	28



## 1. UVOD

“*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*” (CRISPR) je obitelj sekvenci DNA koja je pronađena u genomu prokariota. Obitelj CRISPR se sastoji od grupiranih ponavljajućih palindromskih sekvenci koje su isprekidane razmaknicama. Razmaknice su nukleotidne sekvence podjednake duljine, ali različitog slijeda nukleotida. Ponavljajuće sekvence su veličine od 21 do 37 parova baza. Nukleotidni slijed ponavljajućih sekvenci identičan je unutar iste vrste bakterija, ali se razlikuje među vrstama bakterija. Na početku svakog lokusa CRISPR nalazi se vodeća sekvenca koja je veličine 300 do 500 parova baza (1). Obitelj CRISPR je otkrivena 1987. godine prilikom analize dijela kromosomske DNA bakterije *Escherichia coli* koju su proveli Ishino Y i suradnici (2). Funkcija lokusa CRISPR ostala je nepoznata dugo nakon njegovog otkrića. Jansen i suradnici identificirali su gene koji su uvijek udruženi s lokusom CRISPR te su stoga oni nazvani “*CRISPR associated*” (Cas) geni. Geni Cas su uvijek locirani pored lokusa CRISPR što ukazuje na njihovu funkcionalnu povezanost. Štoviše, geni Cas su prisutni isključivo u bakterijskim vrstama koje imaju lokus CRISPR (1). Prva ideja o funkciji lokusa CRISPR uslijedila je nakon projekta humanog genoma u sklopu kojega je uz deoksiribonukleinsku kiselinu (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) čovjeka i brojnih drugih organizama analizirana DNA mnogih bakteriofaga i plazmida (3). Otkriveno je da se razmaknice lokusa CRISPR poklapaju s DNA bakteriofaga i plazmida, pa su Bolotin A i suradnici zaključili da razmaknice lokusa CRISPR odražavaju “gensku” prošlost kao posljedicu invazije bakteriofaga i plazmida u bakteriju (4,5). Bolotin A i suradnici su istražili korelaciju između osjetljivosti na bakteriofage određenog soja *Streptococcus thermophilus* te broja razmaknica koje posjeduje. Pokazalo se da je na infekciju bakteriofazima otporniji onaj soj *S. thermophilus* koji sadrži više razmaknica unutar vlastitog lokusa CRISPR (5). Postavljena je hipoteza da je lokus CRISPR dio bakterijske DNA koji je uključen u zaštitu bakterije od prodora bakteriofaga i plazmida. Nakon prodora bakteriofaga u bakteriju, ona u svoj lokus CRISPR uvršćuje novu razmaknicu koja je izvedena iz DNA tog bakteriofaga (6). DNA bakteriofaga koja je materijal za integraciju u lokus CRISPR naziva se proto-razmaknica. Kad se proto-razmaknica integrira u lokus CRISPR bakterije - ona postaje razmaknica. Proces prepoznavanja proto-razmaknice i njezinog uvrštenja u lokus CRISPR posreduju enzimi Cas koje

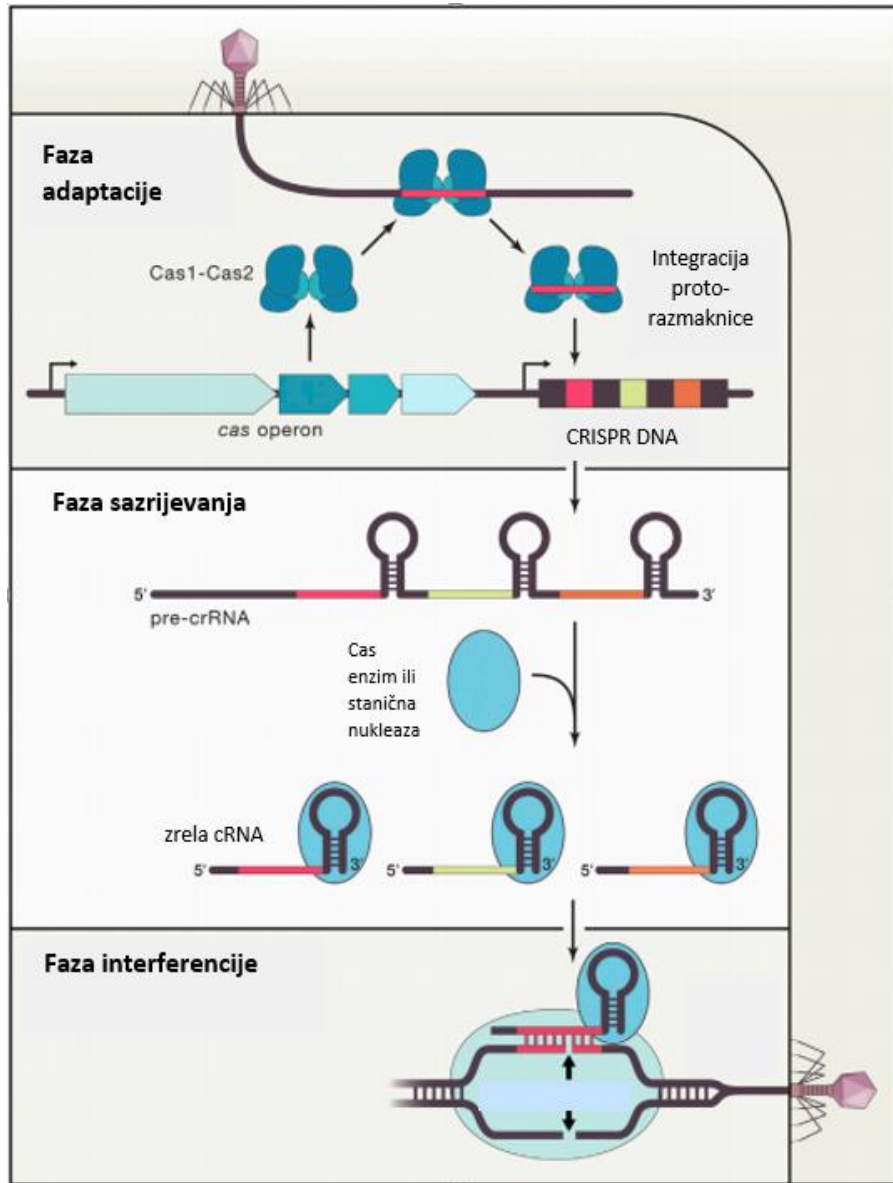
kodiraju geni Cas. Enzimi Cas su endonukleaze koje imaju sposobnost cijepanja DNA. Enzimi Cas prepoznaju proto-razmaknicu uz pomoć kratkog slijeda nukleotida koji uvijek prethodi razmaknici. Taj slijed nukleotida se naziva “*proto-spacer adjacent motif*” (PAM). Uvrštavanjem nove razmaknice bakterija stječe rezistenciju na bakteriofag koji ju je inficirao (6).

Otkriće da lokus CRISPR zajedno s genima/enzimima Cas predstavlja imunološki sustav prokariota, uvelike je zainteresirala znanstvenike za njegovu primjenu. Ubrzo je sustav CRISPR-Cas prenamijenjen u alat za genetsku modifikaciju. U tijeku su brojna istraživanja u kojima se sustav CRISPR-Cas koristi kao terapijska metoda u liječenju nasljednih i drugih bolesti uzrokovanih poremetnjom genoma. Dječje bolesti tako su postale predmet interesa za terapijsku primjenu ciljane modifikacije genoma sljedeće generacije. Neke od bolesti u kojima sustav CRISPR-Cas predstavlja potencijalnu metodu liječenja su Duchenneova mišićna distrofija, spinalna mišićna atrofija te anemija srpastih stanica.

## 2. MEHANIZAM DJELOVANJA I VRSTE SUSTAVA CRISPR-Cas

Lokus CRISPR zajedno s genima Cas sudjeluje u imunološkom odgovoru bakterije na infekciju bakteriofazima ili plazmidima. Faze imuniteta posredovanog sustavom CRISPR-Cas su: a) faza adaptacije; b) faza sazrijevanja te c) faza interferencije (7) :

- a) U fazi adaptacije, bakterija domaćin prepoznaje stranu proto-razmaknicu unutar DNA bakteriofaga te je ugrađuje u vlastiti lokus CRISPR. Ugrađena proto-razmaknica bakteriofaga u lokus CRISPR bakterije domaćina postaje razmaknica. Neposredno prije ugrađivanja u lokus CRISPR, ponavljajuća palindromska sekvenca se udvostručuje (7). Fazu adaptacije posreduju enzimi Cas1 i Cas2. Enzimi Cas1 i Cas2 proizvode proteinski kompleks Cas1-Cas2 koji je neophodan za odvijanje svih stadija adaptacijske faze (7).
- b) Tijekom faze sazrijevanja lokus CRISPR se prepisuje u "*pre-messenger RNA*" (pre-mRNA). Pre-mRNA se potom cijepa u zrele "*messenger RNA*" (mRNA) koju nazivamo "CRISPR RNA" (crRNA). Svaka crRNA se sastoji od razmaknice i ponavljajuće palindromske sekvence. crRNA koja je spojena s jednim ili više enzima Cas čini aktivni kompleks crRNA-Cas.
- c) U fazi interferencije, razmaknica kompleksa crRNA-Cas prepoznaje komplementarnu proto-razmaknicu unutar DNA bakteriofaga uz pomoć dodatne komplementarnosti endonukleaze Cas i sekvence PAM. Nakon što prepozna sekvencu PAM, endonukleaza Cas cijepa DNA bakteriofaga.

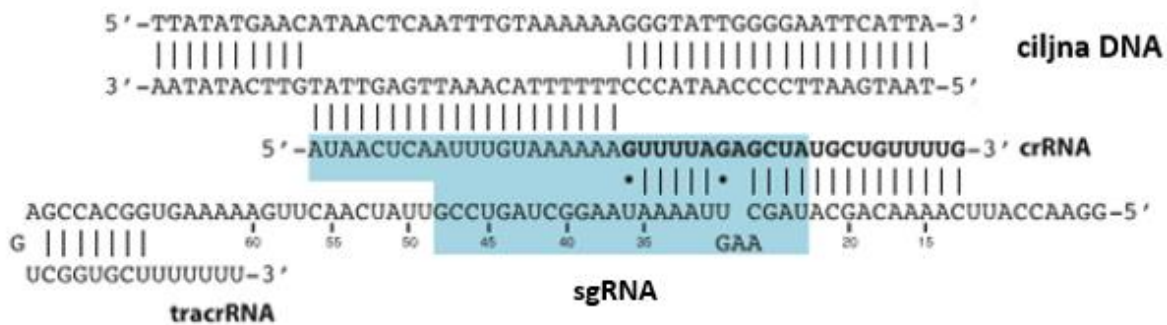


**Slika 1.** Prikazane su faze imuniteta bakterije poredovanog sustavom CRISPR-Cas (9). Prema: Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovic M, Ressel S, Charpentier E. (2018). Tijekom faze adaptacije, kompleks Cas1-Cas2 prepoznaje proto-razmaknicu (dio virusne DNA) koja se potom integrira u lokus CRISPR bakterije domaćina. U sljedećoj fazi dolazi do transkripcije CRISPR DNA u pre-mRNA, nakon čega slijedi njezino procesiranje (uz pomoć enzima Cas ili stanične nukleaze) u zrelu crRNA. U fazi interferencije enzim Cas usmjerava i vodi molekulu crRNA do komplementarnog mjesta na DNA bakteriofaga. Nakon što je došlo do prepoznavanja ciljnog mjesta, enzim Cas cijepa DNA bakteriofaga. U fazi interferencije razreda 1 u cijepanju DNA sudjeluju brojni enzimi Cas, za razliku od razreda 2 gdje je za to zadužen samo jedan enzim Cas. CRISPR - engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*; Cas - engl. *CRISPR associated*; DNA - deoksiribonukleinska kiselina; pre-mRNA - engl. *pre-messenger RNA*; crRNA - CRISPR RNA.

Sustav CRISPR-Cas dijeli se u dva razreda i to na temelju načina na koji se odvija faza interferencije. U fazi interferencije razreda 1 sudjeluju brojni enzimi Cas, dok u fazi interferencije razreda 2 sudjeluje samo jedan enzim Cas. Osim podjele na razrede, CRISPR-Cas se dijeli i u šest tipova i nekoliko podtipova i to na osnovi vrste enzima Cas koje posjeduju. Razred 1 sadrži tipove I, III i IV, a razred 2 tipove II, V i VI (8).

### 3. CRISPR-Cas9

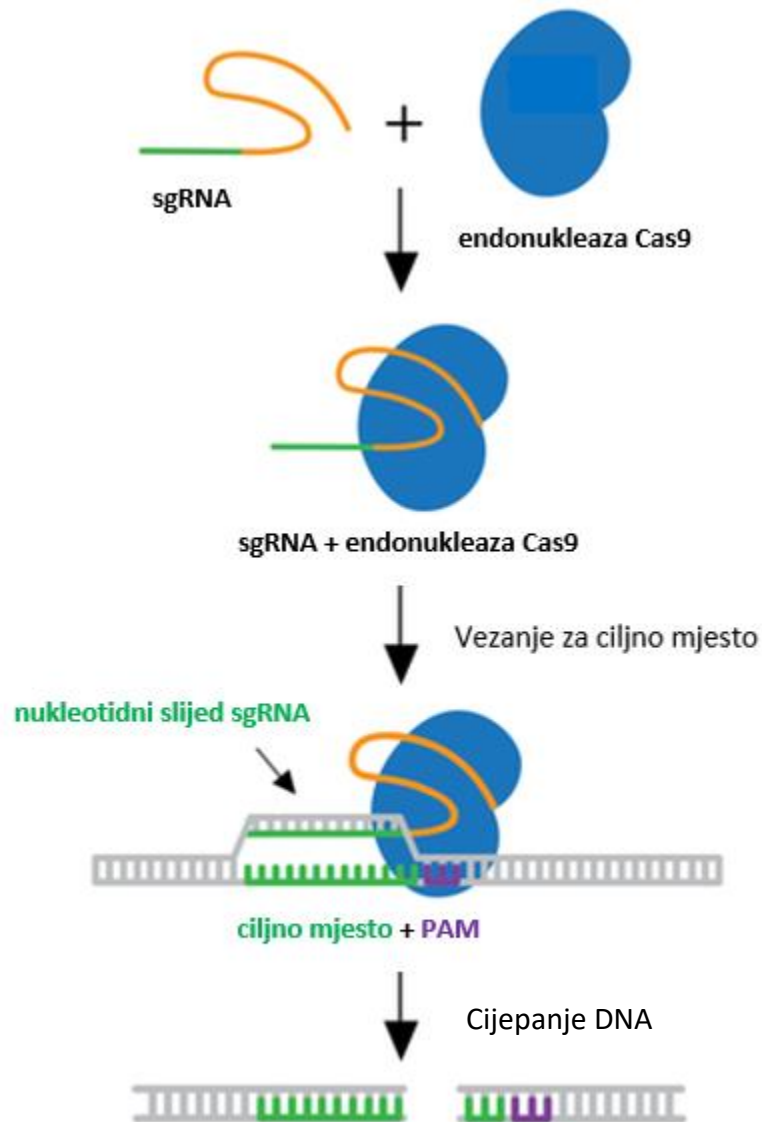
Sustav CRISPR-Cas tipa II posjeduje endonukleazu Cas9. Endonukleaza Cas9 je uključena u sve faze imuniteta posredovanog sustavom CRISPR-Cas9 (7,10). Za funkcioniranje crRNA sustava CRISPR-Cas tipa II potrebna je “*trans-activating CRISPR RNA*” (tracrRNA). tracrRNA formira kompleks sa crRNA. Kompleks tracrRNA:crRNA usmjerava i vodi enzim endonukleazu Cas9 do crRNA-komplementarnog mjesta na DNA. Za normalnu funkciju kompleksa Cas9-tracrRNA:crRNA važna je interakcija pojedinih sastavnica kompleksa uključujući jednolančanu ribonukleinsku kiselinu koju nazivamo vodičem RNA (engl. *single guided RNA*, sgRNA) i čija je uloga presudna za određivanje specifičnog mjesta vezanja na DNA (11). Dizajniranjem sekvence sgRNA moguće je precizno usmjeriti djelovanje enzima endonukleaze Cas9 te na taj način modificirati točno određeni dio genoma.. S tom spoznajom započela je era modifikacije genoma pomoću kompleksa CRISPR-Cas (11).



**Slika 2.** Kompleks tracrRNA:crRNA je prikazan na slici. Plavom bojom je označena sgRNA za određivanje specifičnog mjesta vezanja na DNA (11). Prema: Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) uz dopuštenje autora. tracrRNA - engl. *trans-activating CRISPR RNA*; CRISPR - engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*; DNA - deoksiribonukleinska kiselina.

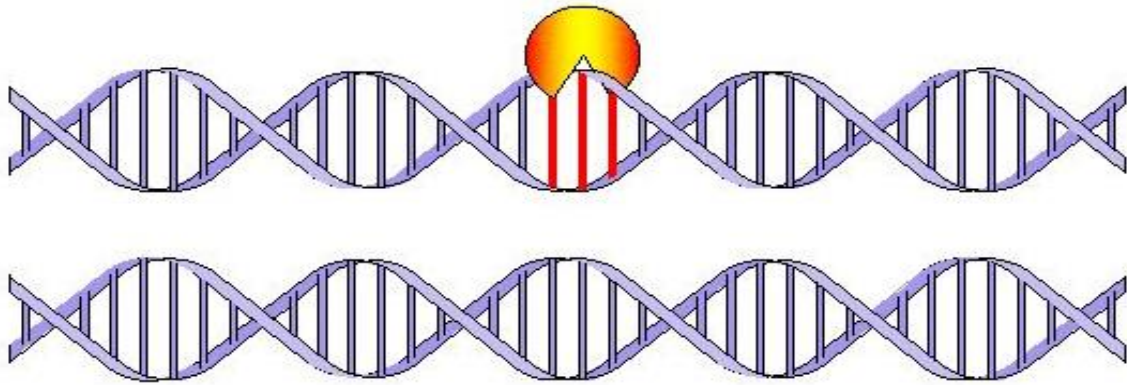
#### 4. MODIFIKACIJA GENA

Za genetsku modifikaciju posredovanu sustavom CRISPR-Cas9 potrebna je: a) dizajnirana sgRNA komplementarna mjestu DNA kojeg se planira modificirati te b) endonukleaza Cas9 koja cijepa dvolančanu DNA na mjestu koje je komplementarno dizajniranoj sgRNA. Osim prepoznavanja komplementarnog mjesta sgRNA na DNA, važan preduvjet uspješnog i specifičnog vezanja, a time i cijepanja DNA posredovanog endonukleazom Cas9 jest i prepoznavanje sekvence PAM. Sekvencu PAM prepoznaje endonukleaza Cas9 te cijepa DNA na mjestu koje je za tri parova baza nizvodno od sekvence PAM. Novonastali dvolančani lom DNA (engl. *double stranded break*, DSB) aktivira endogene mehanizme popravka DNA. Predominantni mehanizam popravka DNA u sisavaca je “*non-homologous end joining*” (NHEJ) pri kojemu se spajaju dva isprekidana kraja DNA. NHEJ dovodi do nakupljanja kratkih insercija i delecija (*indel*) koje pomiču okvir čitanja te dovode do stvaranja preuranjenog STOP kodona (10). Zbog toga se mehanizam za popravljjanje DNA NHEJ koristi za izbacivanje gena iz genetskog zapisa (engl. *gene knockout*) (10). Stvaranje *indel* će pomaknuti okvir čitanja u samo dvije trećine slučajeva (12). Kako bi se izbjegla ograničenja izbacivanja gena iz genetskog zapisa posredstvom indela, izbacivanje gena može se postići delecijom tog gena. Delecija gena postiže se uporabom dvaju kompleksa sgRNA-Cas9 usmjerena na početak i kraj gena kojeg se planira ukloniti. Frekvencija uspješnih delecija je obrnuto proporcionalna veličini delecije (13). Drugi način popravka DSB je “*homology-directed repair*” (HDR) za koji je potreban DNA predložak koji se umeće na mjesto loma. Osim sekvence koju se želi uvrstiti u DNA, predložak mora sadržavati sekvence komplementarne krajevima DSB koje polažu željenu sekvencu na odgovarajuće mjesto. DNA predložak može biti jednolančani oligonukleotidni donor ili fragment dvolančane DNA. Jednolančani oligonukleotidni donor predvodi popravak nastalog loma prema načelima homologne rekombinacije nakon što biva uvršten u DNA. Dvolančani fragment DNA svojim uvrštenjem na mjesto DSB posreduje umetanje željenog gena (engl. *gene knock-in*) (14,15).

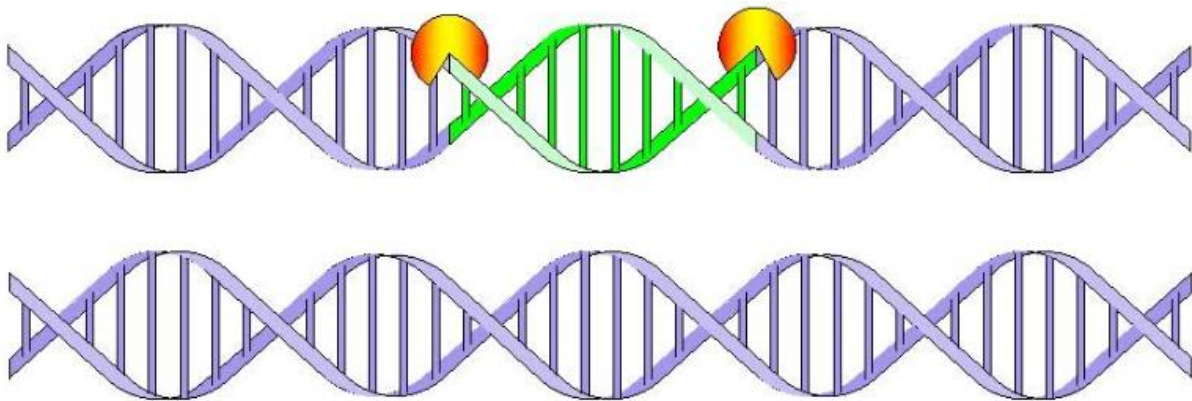


**Slika 3.** Kompleks sgRNA i endonukleaze Cas9. sgRNA je komplementarno vezana za ciljno mjesto na DNA. Endonukleaza Cas9 je vezana za njoj komplementarnu sekvencu PAM. Endonukleaza Cas9 prepoznaje sekvencu PAM i cijepa dvolančanu DNA. Preuzeto s: <https://www.addgene.org/guides/crispr/>. DNA - deoksiribonukleinska kiselina; CRISPR - engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*; Cas - engl. *CRISPR associated*; PAM - engl. *protospacer adjacent motif*; sgRNA – engl. *single guided RNA*.

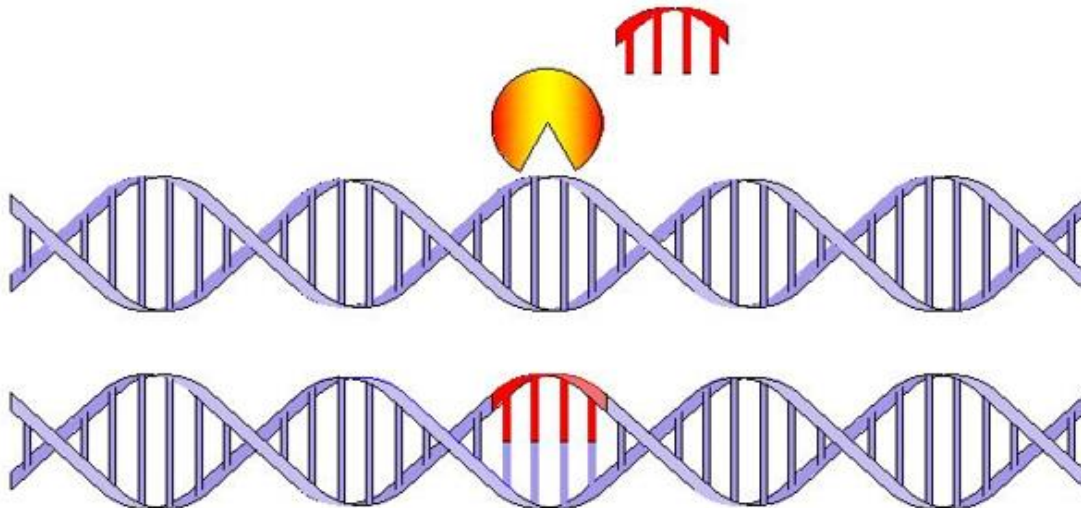




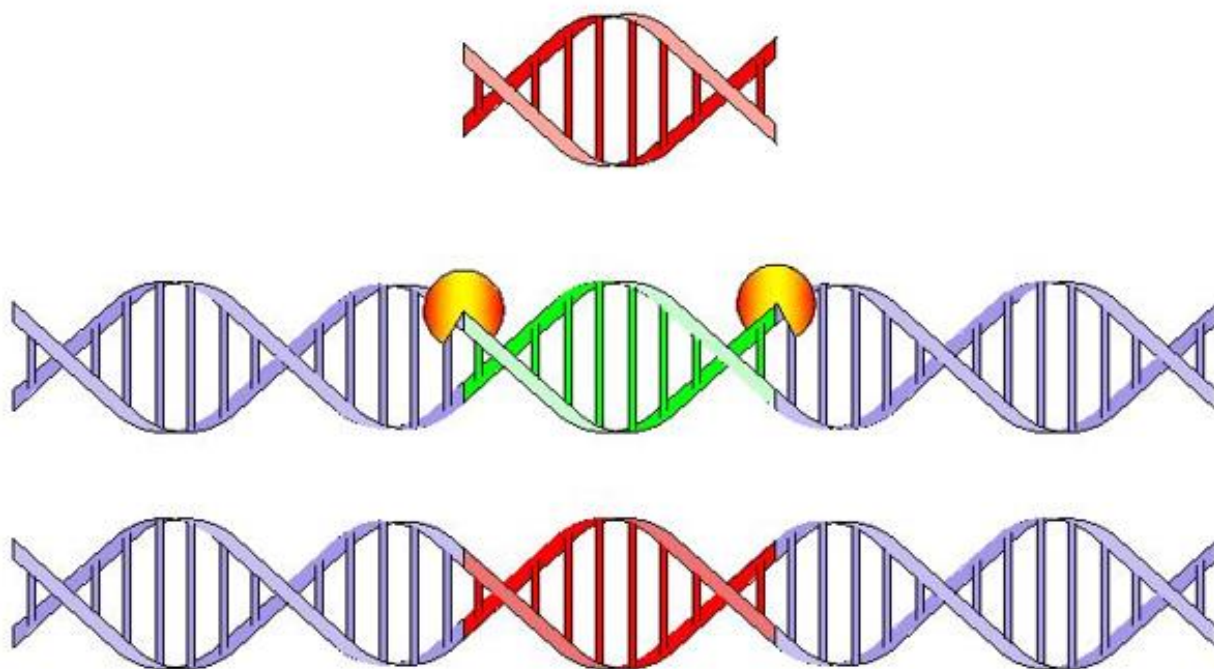
**Slika 4.** Izbacivanje željenog gena (prikazan crveno) iz genetskog zapisa (engl. *gene disruption*). Nakon Cas9 posredovanog loma DNA i posljedičnog NHEJ mehanizma popravka DNA dolazi do akumulacije insercija i delecija koje pomiču okvir čitanja što dovodi do stvaranja preuranjenog STOP kodona. Cas - engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) associated*; DNA- deoksiribonukleinska kiselina; NHEJ - engl. *non-homologous end joining*.



**Slika 5.** Delecija gena (prikazan zeleno) posredstvom dva Cas9 enzima (engl. *gene deletion*). Cas- engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) associated*.



**Slika 6.** Endonukleaza Cas9 lomi DNA te se potom umeće jednolančani DNA predložak koji predvodi popravak DNA prema načelima homologne rekombinacije (engl. *gene correction*). DNA - deoksiribonukleinska kiselina; Cas - engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) associated*.

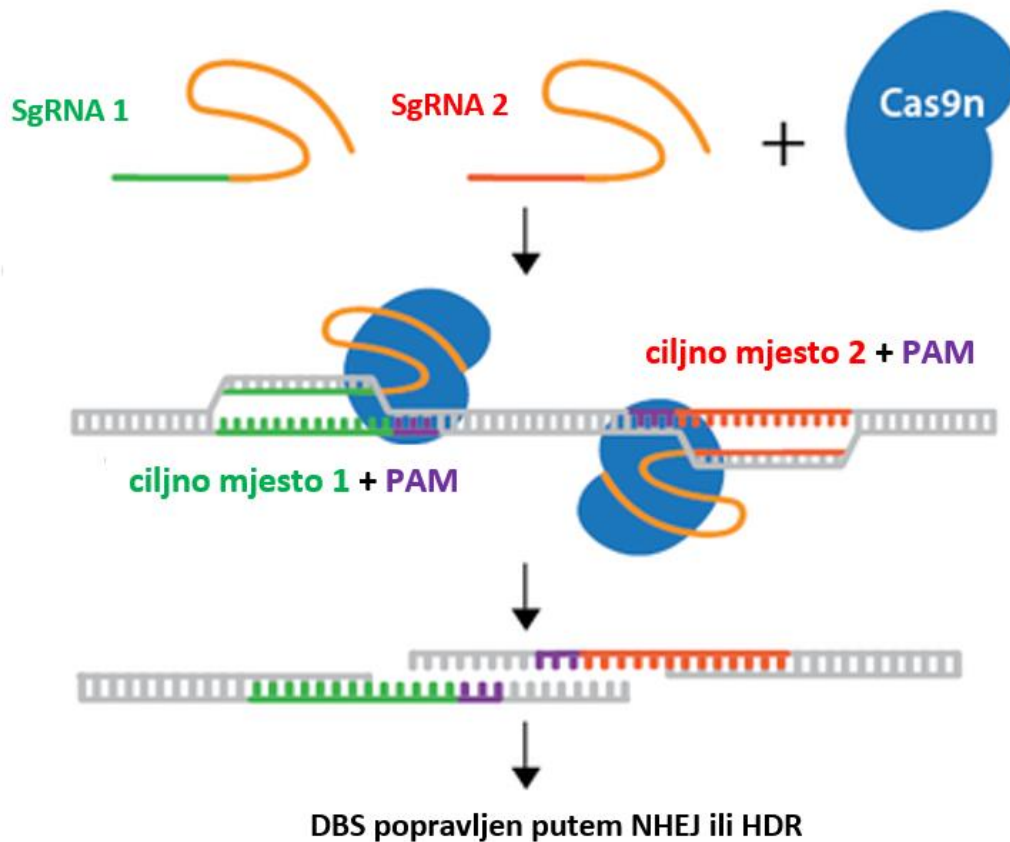


**Slika 7.** Insercija dvolančanog fragmenta DNA nakon loma DNA pomoću dva enzima Cas9 (engl. *gene knock-in*). DNA - deoksiribonukleinska kiselina; Cas - engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) associated*.

## 5. OGRANIČENJA GENETSKE MODIFIKACIJE POMOĆU CRISPR-Cas9 SUSTAVA

Endonukleaza Cas9 cijepa DNA tek nakon što prepozna PAM sekvencu s kojom je komplementarna. Spomenuto uvelike ograničava opseg ciljanja sustava CRISPR-Cas9, odnosno ograničava postotak DNA koja može biti modificirana CRISPR-Cas9 sustavom. Najupotrebljavanija endonukleaza Cas9 za genetsku modifikaciju pripada bakteriji *Streptococcus pyogenes*, po kojoj je dobio ime *Streptococcus pyogenes* Cas9 (spCas9). Učestalost njegove upotrebe pripisuje se jednostavnoj PAM sekvenci, nukleotidnog slijeda “NGG” (N predstavlja bilo koji nukleotid), koja mu omogućuje preinačivanje velikog broja gena. Nedostatak mu je velika masa koja ograničava njegovo prenošenje u stanicu putem virusa. Pronađene su endonukleaze Cas9 manje veličine npr. endonukleaza Cas9 *Neisseria meningitidis* (nmCas9), Cas9 *Staphylococcus aureus* (saCas9) te Cas9 *Campylobacter jejuni* (cjCas9) koji, premda manji veličinom, zahtijevaju složenije PAM sekvence što ograničava njihovu uporabu (3). Zbog NGG PAM sekvence ciljno mjesto endonukleaze spCas9 nalazi se svakih 8 parova baza (10). Mijenjanjem PAM sekvence koju prepoznaje endonukleaza Cas9 povećao bi se opseg ciljanja sgRNA-Cas9 kompleksa (3). Kleinstiver i sur. modificirali su spCas9 tako da su promijenili PAM sekvencu za koju se komplementarno veže i omogućili dohvaćanje onih gena do kojih divlji tip spCas9 ne bi mogao doći (16). Osim potrebe za povećavanjem terapijske širine CRISPR-Cas9 sustava važno je umanjiti mogućnost djelovanja CRISPR-Cas9 izvan ciljnog mjesta tako da se poveća ciljna specifičnost endonukleaze Cas9. Navedeno se može postići korištenjem dvaju sgRNA koje koriste “*nickase* Cas9” (nCas9) ili “*catalytically inactive* Cas9” (dCas9) koji je spojen s restriksijskom endonukleazom Fok I. Endonukleaza Cas9 ima dvije domene s katalitičkom aktivnošću (HNH i RuvC) koje zajedničkim snagama izazivaju DBS. Cas9 HNH domena prekida kontinuitet komplementarnog lanca, dok RuvC domena odcjepljuje nekodirajući lanac virusne DNA (11). Točkasta mutacija u jednoj od ovih domena rezultirala bi endonukleazom nCas9 koji cijepa samo jedan lanac DNA, a mutacijom obaju domena nastao bi katalitički neaktivni dCas9. Pristup putem nCas9 ili dCas9 spojen na Fok I zahtijeva dvije odvojene sgRNA koje bi prepoznale određenu sekvencu na zadanoj udaljenosti jedna od druge što bi znatno umanjilo mogućnost djelovanja CRISPR-Cas9 izvan ciljnog mjesta. Duljina sgRNA također utječe na ciljnu specifičnost, odnosno produljivanje ili skraćivanje sgRNA i

za nekoliko nukleotida može povećati specifičnost sgRNA-Cas9 kompleksa i reducirati djelovanja CRISPR-Cas9 izvan ciljnog mjesta (17,18).



**Slika 8.** Modifikacija DNA pomoću dvije sgRNA i dva enzima nCas9 koji radi mutacije na jednoj od domena imaju sposobnost cijepanja samo jednog lanca DNA. Preuzeto s: <https://www.addgene.org/guides/crispr/>. DNA - deoksiribonukleinska kiselina; sgRNA - RNA vodič, engl. *single guided RNA*; Cas - engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) associated*; nCas9- engl. *nickaseCas9*

## 6. VEKTORI ZA DOPREMANJE CRISPR-Cas9 U STANICE DOMAĆINA

Kako bi se postigla genetska modifikacija pomoću sustava CRISPR-Cas9 potrebno je unijeti sgRNA i Cas9 u stanicu domaćina pomoću vektora. Virusi su najčešće korišteni vektori za CRISPR-Cas9 sustav zbog njihove evolucijom određene sposobnosti prijenosa vlastitog genetičkog materijala u stanicu domaćina. Najčešće korišteni virusi su: “*adeno-associated viruses*” (AAV), adenovirusi te lentivirusi (15). Lentivirusi su pokazali visoku stopu uvrštenja dostavljenog gena u DNA domaćina, no zbog nespecifičnosti lokacije njegovog uvrštenja te opasnosti od predstojeće neželjene mutacije razvijeni su lentivirusi bez sposobnosti uvrštenja u DNA domaćina. Premda sigurniji, navedeni su se virusi pokazali manje učinkovitima. Zbog navedenih ograničenja lentivirusi se koriste u in-vitro uvjetima. Adenovirusi mogu inficirati stanice u mitotičkom i postmitotičkom stanju što omogućuje prijenos komponenti za genetsku modifikaciju neovisno fazi staničnog ciklusa (19). Njihov nedostatak je izazivanje snažnog imunološkog odgovora u domaćina (15). Kako bi se izbjegao drastičan odgovor domaćina na dijelove virusne DNA, projektirana je generacija adenovirusa lišenih njegovih vlastitih gena (20). AAV poput adenovirusa mogu inficirati stanice neovisno o tome jesu li u S ili G0 fazi (15). AAV su jednolančani DNA virusi koji pripadaju obitelji parvovirusa. Poznato je 11 serotipova AAV koji imaju tropizam prema različitim stanicama. Izrazito su korisni kao vektori pri genetskoj modifikaciji jer postižu dugoročnu ekspresiju gena te nisu zabilježeni kao patogeni u čovjeka (21). AAV omogućuju kontrolirano uvrštavanje dostavljenih gena u lokus “*adeno-associated virus integration site 1*” (AAVS1) čime se umanjuje mogućnost za nasumičnim uvrštavanjem dostavljenog gena pa se primjenjuju *in-vivo* (15). Nadalje, veličina AAV virusa jest limitirajući faktor zato što može prenijeti sekvencu od najviše 4.7 kilobaza pa se spCas9 prenosi u zasebnom AAV. Spomenuto dovodi do brojnih poteškoća u genetskoj terapiji jer bi se željena promjena u tom slučaju dogodila samo u stanicama koje su uspjele međudjelovati s oba AAV vektora; onog koji nosi sgRNA i onoga s Cas9. Kako bi se nadvladalo spomenuto ograničenje koristili su se enzimi Cas9 drugih bakterijskih vrsta koji su veličinom manji od spCas9 ili projektirani AAV virus s povećanim kapacitetom koji je mogao prenijeti spCas9 i pripadajuću sgRNA. Usprkos brojnim prednostima, virusni vektori imaju i nekoliko nedostataka kao što su ograničena mogućnost prenošenja

strane DNA zbog malog kapaciteta te aktiviranje imunološkog odgovora domaćina. Zbog toga se javila potreba za ne-virusnim vektorima. U fazi istraživanja su ne-virusni vektori poput plazmida, mRNA nosača i proteinskog nosača (15).

## **7.TERAPIJSKA PRIMJENA CRISPR-Cas9 U PEDIJATRIJI**

### **7.1 Duchenneova mišićna distrofija**

Duchenneova mišićna distrofija je neuromuskularna bolest uzrokovana mutacijom na genu za distrofin (DMD) lociranom na X kromosomu (22). Sastavljen je od 2.6 milijuna parova baza i 79 egzona i najveći je gen u ljudskom genomu (23). DMD kodira distrofin; mišićni citoskeletni protein zadužen za održavanje integriteta stanične membrane (24). Distrofin je zastupljen u skeletnim mišićima te srčanom mišiću (25). Njegov nedostatak očituje se progresivnom degeneracijom mišića koja se na bolesnicima očituje kao gubitak mogućnosti hoda u dobi između 10 i 12 godina. Mišićna slabost kasnije zahvaća i dišnu muskulaturu zbog koje bolesnici s Duchenneovom mišićnom distrofijom naposljetku umiru u trećem desetljeću života zbog zatajenja disanja. Kardiomiopatija također može biti uzrok smrti, no takvi su slučajevi rjeđi (26). U više od 60% slučajeva mutacija koja zahvati DMD gen je delecija jednog ili više egzona koji pomiču okvir čitanja. Pomicanje okvira čitanja rezultira stvaranjem preuranjenih STOP kodona zbog kojih se obustavlja sinteza distrofina (27). Delecije koje ne remete okvir čitanja ne zaustavljaju proces translacije i uzrokuju sintezu frakcioniranog, ali funkcionalnog distrofina (25,28). Takve mutacije se nalaze u Beckerovoj mišićnoj distrofiji. Beckerova mišićna distrofija blaži je oblik X-vezane mišićne distrofije koja je slabije progresivna i nema znatni utjecaj na životni vijek (26). Po uzoru na Beckerovu mišićnu distrofiju u kojoj je unatoč mutacijama sinteza distrofina očuvana, terapijski pristup Duchenneovoj mišićnoj distrofiji usmjeren je na vraćanje okvira čitanja na prvobitni položaj kako bi se omogućio proces translacije i sinteze distrofina. DMD je tipičan primjer monogenske nasljedne bolesti koja se može ispraviti uklanjanjem mutiranih egzona koji se nalaze na regijama koje nisu nužne za sintezu distrofina (29). Modifikacija gena postiže se upotrebom sustava CRISPR-Cas9 koji na nekoliko načina popravljaju okvir čitanja. Jedan od načina je delecija jednog ili više egzona pomoću dvije sgRNA koje su usmjerene na intronske regije koje okružuju određeni egzon ili skupinu egzona (29). Pri tome će učinkovitija biti delecija jednoga nego više egzona. Odabir ciljnog egzona ovisi o lokaciji mutacije koja je zahvatila DMD gen u pojedinog bolesnika (29). U DMD genu nalazi se područje koje je najčešće zahvaćeno mutacijama. Ono se proteže od 45 do 55 egzona. Delecijom cijelog navedenog niza popravila



bi se sinteza distrofina u 60% bolesnika (29). Spomenuta strategija (delecije egzona) oponaša metodu preskakanja egzona (engl. *exon skipping*) antisense oligonukleotidima koji su vezanjem za mutirani egzon priječili njegovu translaciju. Nedostatak te metode je ta što ju pacijenti moraju kontinuirano primjenjivati tijekom života. Međutim, delecijom uzrokovano preskakanje egzona provodi se na razini DNA, što čini trajnu promjenu u genetskom zapisu koja će trajati i nakon diobe stanica (29). Osim delecije cijelog egzona može se postići delecija dijela egzona te time popraviti okvir čitanja. Metoda se zove “CRISPR – *Induced Deletion*” (Cin-del). Iyombre-Engembe i suradnici su u svojoj studiji pomoću dvije sgRNA, usmjerene na 50 i 54 egzon, ispravili mutaciju u mioblastima pacijenta s delecijom od 51 do 53 egzona. Nakon što je u njima postignut lom DNA navedena dva egzona formirala su jedan hibridni egzon. Kako bi fuzija tih dvaju egzona rezultirala popravkom okvira čitanja broj nukleotida koji je izbrisan delecijom morao je biti djeljiv s tri. Zbog toga su izabrali par sgRNA za koji su dokazali da stvaraju hibridni egzon čiji nastanak popravlja okvir čitanja (30). Zbog premise da se CRISPR-Cas-om izazvan DBS nalazi uvijek tri para baza nizvodno od PAM mogli su pretpostaviti gdje će se lom točno dogoditi i prema tome što će se dogoditi s hibridnim egzonom (31). Nedostatak ove metode je to što bi za svaki tip delecije trebalo pronaći par sgRNA koji bi uzrokovao popravak okvira čitanja (30). Ousterout DG i suradnici upotrijebili su nastajanje insercija i delecija (indel) pri NHEJ mehanizmu popravka DNA, nakon Cas9 posredovanog loma DNA, kao način popravka okvira čitanja. Dizajnirali su sgRNA koja je usmjerila Cas9 na egzon 51 DMD gena s delecijom 48-50. Umetanjem indela uspješno su popravili pomak okvira čitanja u trećine postignutih DBS (29). Nastajanje indela može također uzrokovati knockout egzona prekinutog nukleazom. Time se postiglo preskakanje egzona zbog kojega se poremetio okvir čitanja. Navedeni efekt postigli su Li HL i suradnici disrupcijom egzona 45 u DMD genu s delecijom egzona 44 (32). Za razliku od modifikacije DMD gena posredstvom indela, delecijom cijelog egzona postići ćemo željeni rezultat u 100% uspješno provedenih DBS pomoću obje sgRNA. Osim toga proteinski produkt nakon delecije egzona je predvidljiv i već okarakteriziran u Beckerovoj mišićnoj distrofiji (29).

## 7.2 Spinalna mišićna atrofija

Spinalna mišićna atrofija je autosomno recesivna bolest donjeg motoneurona. Uzrokovana je mutacijom na “*survival motor neuron 1*” (SMN1) genu koji kodira “*survival motor neuron*” (SMN) protein koji je zaslužan za održavanje motornih neurona. U 98% slučajeva bolesnici su homozigoti za deleciju SMN1 gena. Unutar ljudskog genoma nalazi se i SMN2 gen koji je homologan SMN1 genu i također kodira SMN protein, ali zbog nekoliko nukleotidnih supstitucija koje ga razlikuju od SMN1, 90% SMN2 u procesu maturacije mRNA izbacuje egzon 7 (33). Zbog toga nastaje frakcionirani i nestabilni protein SMN koji ne može obaviti svoju funkciju te dolazi do degeneracije  $\alpha$ -motoričkih neurona unutar prednjeg roga kralježničke moždine te posljedično slabljenja mišića. Iako u većini slučajeva proizvodi nefunkcionalan protein, SMN2 gen je jedina kompenzacija nedostatku SMN1 gena. Stoga broj kopija SMN2 gena u bolesnika sa SMA korelira s težinom kliničke slike (34). Razlikujemo četiri tipa SMA. Najteži oblik bolesti je SMA tip I, gdje bolesnici imaju samo dvije kopije SMN2 gena, dovodi do smrti unutar dvije godine bolesnikova života. SMA je najčešći hereditarni uzrok smrti u djece, stoga je važnost pronalaska adekvatne genetske terapije velika. S obzirom na to da je razlika gena SMN2, zaslužna za izostajanje egzona 7 i time adekvatnog SMN proteina, u nukleotidnoj supstituciji C u T na poziciji 6 u egzonu 7 postavila se hipoteza da bi zamjena tih dvaju nukleotida vodila stvaranju funkcionalnog proteina. C u T zamjena pospješila je inaktivaciju “*exonic splicing enhancer*” (ESE) te aktivaciju “*exonic splicing silencer*” (ESS). ESE pospješuje spajanje egzona u procesu maturacije mRNA, a ESS njegovo izostajanje (35). Aktivirani ESS prepoznat je od hnRNP A1 i hnRNP A2. hnRNP su molekule koje sudjeluju u prekrajanju pre-mRNA u mRNA. Vezno mjesto hnRNP A1 je “*intronic splicing silencer-N1*” (ISS-N1) lociran na intronu 7 (35,36). Vezivanjem hnRNP A1 za pripadajući ISS-N1 uzrokuje izostanak spajanja egzona 7 u procesu maturacije pre-mRNA u mRNA. Analogno tome hnRNP A2 vezanjem za ISS + 100 suzbija spajanje egzona 7 u maturiranu mRNA (37). Li J-J i suradnici u svom su istraživanju koristeći CRISPR-Cas9, za ciljanu disrupciju ISS-N1 i ISS+100, ispravili pogrešku spajanja egzona 7 u SMN2 genu i vratili funkcionalan SMN protein. Istraživanje se provodilo na induciranim pluripotentnim matičnim stanicama (engl. *induced pluripotent stem cells*, iPSC) i zigotama miša (37). Za razliku od

trenutačno odobrenog lijeka *Nusinersen* (Spiniraza), koji vezanjem za ISS-N1 blokira njegovo djelovanje, CRISPR-Cas modifikacija uzrokuje trajnu inaktivnost ISS-N1 što otklanja potrebu za opetovanim intratekalnim injekcijama (38). Prednost pred drugim načinima reparacije SMN gena je u tome što se modificiraju introni čime se izbjegavaju neželjene mutacije pomaka okvira čitanja koje može izazvati NHEJ na egzonima (37). Valetdinova K i suradnici homolognom su rekombinacijom pomoću jednolančanog oligonukleotidnog donora i sustava CRISPR-Cas9 sustava postigli supstituciju T u C u egzonu 7 iPSC (39). Modifikacija SMN gena pomoću NHEJ popravljачkog mehanizma uspješnija je nego putem homologne rekombinacije (37).

### 7.3 Anemija srpastih stanica

Anemija srpastih stanica je vrlo česta nasljedna hemoglobinopatija uzrokovana mutacijom u genu koji kodira  $\beta$ -globinski lanac hemoglobina. Hemoglobin je molekula sastavljena od četiri globinska lanca koja su vezana na kofaktor hem za koji se veže kisik. Hemoglobin je izrazito važna molekula zato što omogućuje dopremanje kisika svakoj stanici u tijelu. Tijekom života, hemoglobin je sastavljen od različitih globinskih lanaca i shodno tome različiti geni upravljaju njegovom sintezom. Razlikujemo fetalni hemoglobin (HbF) koji je sastavljen od dva  $\alpha$  i dva  $\gamma$ -globinska lanca (40). U prvim mjesecima života on biva zamijenjen adultnim hemoglobinom (HbA) koji je sastavljen od dva  $\alpha$  i dva  $\beta$ -globinska lanca (40). HBB gen kodira  $\beta$ -globinski lanac hemoglobina. Anemija srpastih stanica je monogeni nasljedna hemoglobinopatija u kojoj je došlo do supstitucije nukleotida A u T u šestom kodonu HBB gena zbog koje se pri translaciji dogodila zamjena aminokiseline glutamin s valinom koja dovodi do stvaranja abnormalnih  $\beta$ -globinskih podjedinica hemoglobina. Takve srpaste  $\beta$ -globinske podjedinice u deoksigeniranom se stanju polimeriziraju zbog čega eritrocit poprima oblik polumjeseca ili srpa. Sposobnost tako promijenjenih eritrocita da izazovu okluziju krvnih žila glavni je patofiziološki mehanizam srpaste anemije. Osim toga eritrociti s hemoglobinom S skloni su hemolizi što dovodi do kronične anemije u takvih bolesnika. Anemija srpastih stanica je obilježena pojavom akutne ili kronične boli, infarktima i zatajenjem brojnih organa te ranim mortalitetom (40). Terapijske su mogućnosti oskudne unatoč tome što je bolest već dugo istraživana i dobro poznata. Osim transfuzija krvi u praksi se koriste hidroksiurea i L-glutamin koji ne mogu u potpunosti spriječiti posljedice bolesti. Upravo radi nedovoljno dobrih terapijskih mogućnosti bolesnici su primorani na transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica (engl. *hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT). HSCT može biti analogna te su tada hematopoetske matične stanice dobavljene od ljudskog leukocitnog antigena (engl. *Human Leukocyte Antigen*, HLA) podudarnog ili HLA identičnog srodnika. Ova metoda je vrlo ograničena radi manjka histokompatibilnih davatelja. Komplikacije alogene HSCT kao što je odbacivanje transplantata ili reakcija transplantata prema primaocu (engl. *graft versus host disease*, GVHD) mogu se izbjeći korištenjem autolognih matičnih stanica koje bi se nakon genetske modifikacije transplantirale u koštanu srž. Za preinaku gena koristi se

CRISPR-Cas9 sustav koji koristi nukleaznu aktivnost Cas9 enzima za postizanje loma DNA na mjestu mutacije te uz DNA predložak omogućuje homolognu rekombinaciju i umetanje ispravne  $\beta$ -globinske sekvence (41). 2008. godine publiciran je protokol kreiranja iPSC nakon kojega su uspješno producirane i hematopoetske matične stanice koje su mogući izvor za autolognu transplantaciju koštane srži. One omogućuju da se unatoč slaboj učinkovitosti HDR posredovanom popravku gena izdvoje i umnože one stanice koje su uspješno genetski korigirane (41). Huang X i suradnici su koristili iPSC dobivene od bolesnika koji nosi mutaciju HBB gena karakterističnu za anemiju srpastih stanica. Uspješno su korigirali HBB gen pomoću sgRNA i Cas9 posredovanog HDR mehanizma popravka DNA i DNA predložka koji je sadržavao divlji tip HBB gena (42). Osim direktnog modificiranja HBB gena, bolesnicima s anemijom srpastih stanica se može pomoći tako da se stimulira ponovna sinteza fetalnog hemoglobina. Watson J i suradnici su u svojoj studiji naveli da novorođenčad s anemijom srpastih stanica nema izraženih komplikacija bolesti radi prisutnosti HbF (43). Iako HbF nakon 6 mjeseci djetetova života zamjenjuje HbA ta zamjena nije nepovratna. Otkriveno je da pojedinci s nasljednom perzistencijom fetalnog hemoglobina (*hereditary persistence of fetal globin*, HPFH) imaju mutacije u  $\gamma$ -globinskim genima koje onemogućuju vezanje blokatora transkripcije fetalnog hemoglobina BCL11A i ZBTB7A (44). Osobe s HPFH nemaju nikakvih posljedica vezanih uz povišenu koncentraciju fetalnog hemoglobina u krvi, ali je primjećeno da su kliničke slike tih bolesti blaže ukoliko istovremeno imaju anemiju srpastih stanica ili  $\beta$ -talasemiju (45). Martyn i suradnici su koristeći CRISPR-Cas9 proizveli mutacije karakteristične za HPFH i spriječili vezanje BCL11A i ZBTB7A te povećali ekspresiju  $\gamma$ -globinskog gena i HbF (44).

## **ZAKLJUČAK**

Genetska modifikacija putem sustava CRISPR-Cas9 poželjna je metoda modifikacije genoma zbog svoje jednostavnosti, niske cijene te mogućnosti preinake velikog broja gena. Omogućuje uklanjanje ili ispravljanje neželjenih mutacija što u konačnici dovodi do izlječenja određene bolesti. Jedna od najvećih prednosti terapijskog pristupa putem sustava CRISPR-Cas9 jest to što izaziva trajnu promjenu genetskog zapisa, odnosno ne mora se opetovano primjenjivati nakon što je gen uspješno izmijenjen. Trajnost genetske promjene njegova je velika prednost, ali i nedostatak ukoliko djelovanje izvan ciljnog mjesta pogodi neki od važnih gena. Upravo iz tog razloga CRISPR-Cas9 još uvijek nije postao zlatni standard u terapiji monogenских bolesti. Trenutno su u tijeku brojna istraživanja usmjerena k povećanju ciljne specifičnosti sustava CRISPR-Cas9 te posljedičnog smanjivanja djelovanja izvan ciljnog mjesta.

## **ZAHVALE**

Po završetku, zahvaljujem se svom mentoru doc.dr.sc. Mariu Ćuku koji je svojim savjetima omogućio izradu ovog diplomskog rada. Zahvalila bih se i svojoj obitelji te dečku i prijateljima koji su mi uvelike olakšali put kroz ovih šest godina Medicinskog fakulteta. Osobito zahvaljujem mom djedu koji mi je veliki uzor i potpora i koji je u svojoj 85. godini života pronašao snage i volje da mi pomogne u izradi slika za ovaj diplomski rad.

## LITERATURA

1. Jansen R, Embden JDA van, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43:1565–75.
2. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169:5429–33.
3. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun.* 2018;9:1911.
4. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005;60:174–82.
5. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 2005;151:2551–61.
6. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science (80- ).* 2007;315:1709–12.
7. Amitai G, Sorek R. CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14:67–76.
8. Koonin E V, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR–Cas systems. *Curr Opin Microbiol.* 2017;37:67–78.
9. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR–Cas: Backward and Forward. *Cell.* 2018;172:1239–59.
10. Pickar-Oliver A, Gersbach CA. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. Vol. 20, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Nature Publishing Group; 2019. p. 490–507.
11. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (80- ).* 2012;337:816–21.
12. Lappalainen T, Sammeth M, Friedländer MR, ‘t Hoen PAC, Monlong J, Rivas MA, et al. Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans. *Nature.* 2013;501:506–11.
13. Canver MC, Bauer DE, Dass A, Yien YY, Chung J, Masuda T, et al. Characterization of Genomic



Deletion Efficiency Mediated by Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats (CRISPR)/Cas9 Nuclease System in Mammalian Cells. *J Biol Chem.* 2014;289:21312–24.

14. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:229–57.
15. Luther DC, Lee YW, Nagaraj H, Scaletti F, Rotello VM. Delivery approaches for CRISPR/Cas9 therapeutics in vivo : advances and challenges. *Expert Opin Drug Deliv.* 2018;15:905–13.
16. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar V V, Nguyen NT, Zheng Z, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature.* 2015;523:481–5.
17. Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 2014;24:132–41.
18. Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol.* 2014;32:279–84.
19. Kozarsky KF, Wilson JM. Gene therapy: adenovirus vectors. *Curr Opin Genet Dev.* 1993;3:499–503.
20. Ehrke-Schulz E, Schiwon M, Leitner T, Dávid S, Bergmann T, Liu J, et al. CRISPR/Cas9 delivery with one single adenoviral vector devoid of all viral genes. *Sci Rep.* 2017;7:17113.
21. Wong TWY, Cohn RD. Therapeutic Applications of CRISPR/Cas for Duchenne Muscular Dystrophy. *Curr Gene Ther.* 2018;17:301–8.
22. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell.* 1988;53:219–28.
23. Long C, Amoasii L, Bassel-Duby R, Olson EN. Genome Editing of Monogenic Neuromuscular Diseases. *JAMA Neurol.* 2016;73:1349.
24. Cohn RD, Campbell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve.* 2000;23:1456–71.
25. Fairclough RJ, Wood MJ, Davies KE. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat Rev Genet.* 2013;14:373–8.
26. Cai A, Kong X. Development of CRISPR-Mediated Systems in the Study of Duchenne Muscular Dystrophy. *Hum Gene Ther Methods.* 2019;30:71–80.

27. Maggio I, Stefanucci L, Janssen JM, Liu J, Chen X, Mouly V, et al. Selection-free gene repair after adenoviral vector transduction of designer nucleases: rescue of dystrophin synthesis in DMD muscle cell populations. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:1449–70.
28. Verhaart IEC, Aartsma-Rus A. Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Neurol.* 2019;15:373–86.
29. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2015;6:6244.
30. Iyombe-Engembe J-P, Ouellet DL, Barbeau X, Rousseau J, Chapdelaine P, Lagüe P, et al. Efficient Restoration of the Dystrophin Gene Reading Frame and Protein Structure in DMD Myoblasts Using the CinDel Method. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2016;5:e283.
31. Zheng Q, Cai X, Tan MH, Schaffert S, Arnold CP, Gong X, et al. Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells. *Biotechniques.* 2014;57:115–24.
32. Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, et al. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports.* 2015;4:143–54.
33. Monani UR. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet.* 1999;8:1177–83.
34. McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR, et al. Identification of Proximal Spinal Muscular Atrophy Carriers and Patients by Analysis of SMNT and SMNC Gene Copy Number. *Am J Hum Genet.* 1997;60:1411–22.
35. Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, de Stanchina E, Krainer AR. Determinants of Exon 7 Splicing in the Spinal Muscular Atrophy Genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet.* 2006;78:63–77.
36. Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Bennett CF, Krainer AR. Antisense Masking of an hnRNP A1/A2 Intronic Splicing Silencer Corrects SMN2 Splicing in Transgenic Mice. *Am J Hum Genet.* 2008;82:834–48.
37. Li J-J, Lin X, Tang C, Lu Y-Q, Hu X, Zuo E, et al. Disruption of splicing-regulatory elements using CRISPR/Cas9 to rescue spinal muscular atrophy in human iPSCs and mice. *Natl Sci Rev.* 2020;7:92–101.

38. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, et al. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med.* 2017;377:1723–32.
39. Valetdinova KR, Ovechkina VS, Zakian SM. Methods for Correction of the Single-Nucleotide Substitution c.840C>T in Exon 7 of the SMN2 Gene. *Biochem.* 2019;84:1074–84.
40. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4:18010.
41. Demirci S, Leonard A, Haro-Mora JJ, Uchida N, Tisdale JF. CRISPR/Cas9 for Sickle Cell Disease: Applications, Future Possibilities, and Challenges. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2019. p. 37–52.
42. Huang X, Wang Y, Yan W, Smith C, Ye Z, Wang J, et al. Production of Gene-Corrected Adult Beta Globin Protein in Human Erythrocytes Differentiated from Patient iPSCs After Genome Editing of the Sickle Point Mutation. *Stem Cells.* 2015;33:1470–9.
43. Watson J, Starman AW, Bilello FP. The significance of the paucity of sickle cells in newborn negro infants. *Am J Med Sci.* 1948;215:419–23.
44. Martyn GE, Wienert B, Yang L, Shah M, Norton LJ, Burdach J, et al. Natural regulatory mutations elevate the fetal globin gene via disruption of BCL11A or ZBTB7A binding. *Nat Genet.* 2018;50:498–503.
45. Wang X, Thein SL. Switching from fetal to adult hemoglobin. *Nat Genet.* 2018;50:478–80.

## **ŽIVOTOPIS**

### Osobni podatci:

Ime i prezime: Iva Mohler

Datum rođenja: 26.04.1996

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje:

2002.-2010.- OŠ Augusta Šenoae, Zagreb

2010.-2014.- II. Gimnazija, Zagreb

2014.-2020.- Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

### Aktivnosti:

2016.-2018.- članica vodstva Studentske sekcije za kardiologiju

2018./2019.- predsjednica Studentske sekcije za kardiologiju