

# Razvoj lentivirusne tehnologije i unos konstrukta CRISPR/Cas9 u modelne organizme in vivo i in vitro

---

Medić, Krševan

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:293729>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Krševan Medić

**Razvoj lentivirusne tehnologije i unos  
konstrukta CRISPR/Cas9 u modelne  
organizme *in vivo* i *in vitro***

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Krševan Medić

**Development of lentiviral technology and  
introduction of CRISPR/Cas9 constructs into  
*in vivo* and *in vitro* model organisms**

Bachelor thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu Preddiplomskog sveučilišnog studija Biologije na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## Razvoj lentivirusne tehnologije i unos konstrukta CRISPR/Cas9 u modelne organizme *in vivo* i *in vitro*

Krševan Medić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Modelni organizmi ključna su komponenta gotovo svakog biološkog istraživanja današnjice. Ovaj završni rad predstavlja pregled ključnih metoda unosa velikih konstrukata DNA u stanične kulture i modelni organizam, miša, te njihovih uloga kao glavnih eksperimentalnih modela. Genetičko inženjerstvo modelnih staničnih sustava i organizama te njihove genetičke preinake omogućile su detaljne analize staničnih procesa koje uključuju brojne genske interakcije i interakcije njihovih produkata. Tako dobivena nova saznanja o staničnim procesima kompletiraju sliku o mehanizmima razvoja multifaktorijskih bolesti, biokemijskim putevima metabolizma i molekularnoj osnovi razmnožavanja. Sustav CRISPR/Cas9 adaptiran je iz bakterija kod kojih služi kao stečena „imunost“ protiv virusa. Adaptacija ovog bakterijskog principa razgradnje strane DNA u tehnologiju za precizno uređivanje genoma ima gotovo neograničeni potencijal u genetičkom inženjerstvu. Osim toga, sustav CRISPR/Cas9 u kombinaciji s tehnologijom unosa transgena u modele *in vitro* (stanice) i *in vivo* (cijele organizme) pomoću lentirusa otvara nova vrata razvoju genske terapije. Najčešći virusni modeli za unos transgena dolaze iz porodice *Retroviridae*, s virusom humane imunodeficijencije (HIV) kao glavnim lentivirusnim modelom. Lentivirusna dostava transgena posebno je važna zbog stabilne ugradnje transgena u genom u svrhu konstitutivne ekspresije. Stoga je primjena CRISPR/Cas9 sustava u kombinaciji s lentiviralnim unosom transgena u modelne sustave vrlo moderna metoda koja se koristi se u genskoj terapiji ali i drugim molekularno biološkim, biomedicinskim i medicinskim istraživanjima.

Ključne riječi: lentiviralna tehnologija, genetičko inženjerstvo, CRISPR/Cas9, genska terapija  
(24 stranica, 9 slika, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

# Development of lentiviral technology and introduction of CRISPR/Cas9 constructs into *in vivo* and *in vitro* model organisms

Krševan Medić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Model organisms are key components in almost all biological research. This bachelor thesis represents an overview of key methods for delivery of large DNA constructs into model cell lines in culture and/or model organisms such as mice. Here, I also present an overview of their role as main experimental models. Genetic engineering and genetic modifications of cell and organismal models enabled unraveling the intricate networks of cellular processes involving many gene interaction and interactions of their products. The acquired knowledge enables understanding cellular processes underlying complex diseases, metabolic pathways and molecular basis of procreation. Development of new technologies led to establishment of CRISPR/Cas9 method originating from bacteria as one of the earliest examples of acquired “immunity”. Adaption of this technology into a precise genome editing tool holds almost unlimited potential in genetic engineering. Furthermore, CRISPR/Cas9 system in combination with lentiviral technology for delivery of transgenes into *in vitro* (cells) and *in vivo* (organisms) models opens new avenues for development of gene therapy. The most useful viral models for delivery of transgenes are those from the family *Retroviridae* with the emphasis on the main model, the human immunodeficiency virus (HIV). Lentiviral gene delivery is especially important due to its ability to stably integrate the transgene of interest into the host genome for constitutive gene expression. Therefore, CRISPR/Cas9 system combined lentiviral delivery of transgenes represents state of the art methodology in gene therapy, but also in many other studies in molecular biology, biomedicine and medicine field.

Keywords: lentiviral delivery, genetic engineering, CRISPR/Cas9, gene therapy  
(24 pages, 9 figures, 45 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. Vlatka Zoldoš, PhD

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. RAZVOJ TEHNOLOGIJE CRISPR/Cas9 .....</b>	<b>3</b>
2.1. MEHANIZAM DJELOVANJA SUSTAVA CRISPR/Cas9.....	4
2.2. MODIFIKACIJE SUSTAVA CRISPR/Cas9.....	6
2.3. <i>In vitro</i> UNOSA KAZETA CRISPR/Cas9.....	6
<b>3. PORODICA VIRUSA <i>Retroviridae</i> .....</b>	<b>10</b>
3.1. GRAĐA I STRUKTURA GENOMA VIRUSA HIV .....	11
3.2. RAZVOJ LENTIVIRUSNE TEHNOLOGIJE.....	14
<b>4. UNOS LENTIVIRUSNIH KONSTRUKATA U <i>in vivo</i> I <i>in vitro</i> MODELE.....</b>	<b>17</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>19</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
<b>7. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>24</b>

## 1. UVOD

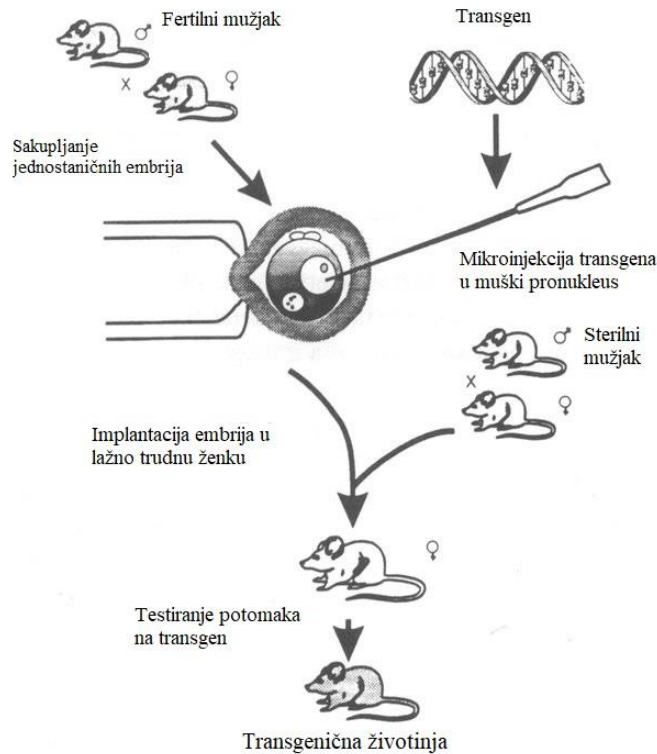
Modelni organizmi danas su nezamjenjivi dio bioloških istraživanja. Njihovoj širokoj primjeni u molekularnoj biologiji prethodila je metoda 'redukcionizma' koja se fokusira na istraživanje osnovnih staničnih procesa poput translacije ili transkripcije u što jednostavnijim organizmima, primjerice u bakteriji *Escherichia coli*. Ove metode rezultirale su mnogim bitnim otkrićima u molekularnoj biologiji, ali rad na složenijim biološkim procesima, izradi lijekova i kliničkim istraživanjima zahtijevao je složenije modele (Saupe i Supattapone 2008). Neke od glavnih karakteristika složenijih modelnih organizama koji su optimalni za provođenje laboratorijskih eksperimenata su: kratki životni ciklus, velik broj potomaka i kratko generacijsko vrijeme. Modelni organizmi su najčešće fizički manje morfologije kako bi bili optimalni za laboratorijske uvjete manjih dimenzija i zauzeli što manje prostora. Za neke modelne organizme, poput miša (*Mus musculus*) ili štakora (*Rattus norvegicus*), potrebne su posebne nastambe i predviđeni prostori za uzgoj u kontroliranim uvjetima vlage i temperature, dok jednostavniji organizmi kao *E. coli* ili *Saccharomyces cerevisiae* zauzimaju iznimno malo prostora i lakše ih je održavati u laboratoriju bez posebnih dodatnih uvjeta. Navedeni organizmi također su često podložni mutacijama te se lako genetski modificiraju zbog jednostavnosti genoma što je iznimno korisno u genetičkom inženjerstvu i modernim genetičkim i epigenetičkim istraživanjima. Također, modelni organizmi kroz generacije procesima križanja i genetske manipulacije postaju standardizirani sojevi kako bi se stvorili jednaki uvjeti za provođenje eksperimenata i istraživanja na njima u cijelom svijetu (Ankeny i Leonelli 2011). Genetska manipulacija zadnjih nekoliko godina upotrebom sustava CRISPR (eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) Cas (eng. *CRISPR associated protein*) transformirala je istraživanja u biologiji i medicini (Ran i sur. 2013). Genetski modificirani miševi i različite *in vitro* stanične linije pokazali su se kao koristan alat u modeliranju genetski uzrokovanih poremećaja i biologije razvoja. Novim metodama genetske modifikacije otkrile su se brojne funkcije pojedinih gena, analizirali su se metabolički putevi i modifikacije biokemijskih svojstava proteina što je omogućilo razvoj novih lijekova i mogućnost borbe s mnogim do tada „neizlječivim“ bolestima (Kato i Takada 2017).

Miš je prije sto godina postao glavni modelni organizam u *in vivo* istraživanjima zbog prirodne tendencije razvoja brojnih ljudskih bolesti kao što su rak, dijabetes ili kardiovaskularne bolesti. Relativno su ekonomičan modelni organizam sisavaca, ne zahtijevaju intenzivnu brigu niti



puno prostora te je lako njima rukovati. Velika prednost je i kratko generacijsko vrijeme koje u prosjeku traje oko 9-10 tjedana (Gurumurthy' i sur. 2021). Razvoj novih tehnologija omogućio je preciznu manipulaciju gena u miševima generirajući tzv. transgenične miševe. Takvi miševi, po najjednostavnijoj definiciji, su genetski modificirani miševi koji u svojem genomu sadrže neku stranu sekvencu DNA nazvanu transgenom. Unos strane sekvence DNA koristi se za utišavanje ili prekida funkcije određenih gena kako bi se proučila njihova funkcija što se naziva *knockout* ili za povećanje ekspresije gena ciljajući promotorska mjesta. Transgen također može kodirati za novo svojstvo ili protein poput proteina za sintezu markera GFP (eng. *green fluorescent protein*) kod „svjetlećih“ miševa u koje je ugrađen gen za sintezu proteina GFP što se naziva *knock in* (Day i sur. 2014). Prvi transgenični miševi proizvedeni su 1974. kada su Rudolph Jaenisch i Beatrice Mintz inficirali embrio miša SV40 (eng. *simian virus 40*) virusom. Strana DNA bila je prisutna u svim stanicama odraslih miševa čime su dokazali mogućnost unosa transgena u genom miša. Takvi miševi nisu prenijeli transgen potomstvu jer DNA nije bila stabilno integrirana u genom. Prva stabilna integracija transgena u genom miša uspostavljena je 1980. godine gdje su Jon Gordon i Frank Ruddle mikroinjekcijom pročišćene strane DNA u jezgru zigote miša uspješno stabilno integrirali transgen što je omogućilo nasljeđivanje transgena na potomke (Hanahan i sur. 2007).

Sukladno tome, danas postoje 2 glavna načina za proizvodnju transgeničnih miševa. Prvi način je manipulacija embrionalnih matičnih stanica gdje se matične stanice izoliraju iz blastociste i izlažu se konstrukt DNA koji sadrži sekvence za homolognu rekombinaciju s genomskom DNA. Nakon selekcije stanica u kulturi za ugrađeni transgen, stanice se ubrizgavaju mikroinjektiranjem u novu blastocistu koja se implantira u lažno trudnu ženku tretiranom progesteronom. Potomci nastali ovim putem su mozaičnog genoma te je potrebno provesti dodatna križanja i analizu genoma kako bi uspostavili čiste transgenične miševe (Richardson i sur. 1997). Drugi, danas češći način, jest mikroinjektiranje konstrukta DNA u pronukleus zigote. DNA se integrira u jedan ili više lokusa kroz prve diobe zigote što uzrokuje i do nekoliko stotina kopija transgena u genomu (**Slika 1.**) Ova metoda je puno brža od prethodne, ali rizik predstavlja nasumična ugradnja transgena u genom miša jer postoji mogućnost da se transgen ugradi u genetički aktivna mjesta što vodi do štetnih mutacija ili da se ugradi u lokus bogat konstitutivnim heterokromatinom uslijed čega se gubi ekspresija transgena (Liu i sur. 2013). Tehnologija CRISPR/Cas9 uspješno rješava problem nasumične integracije jer omogućuje precizno ciljanje gena i njihovu manipulaciju bez potrebe za procesom modifikacije embrionalnih matičnih stanica.



**Slika 1.** Shematski prikaz proizvodnje transgeničnog miša mikroiinjektiranjem transgena u pronukleus zigote. Embrio s ugrađenim transgenom se ugrađuje u lažno trudnu ženku, a dobiveni potomci se testiraju na postojeći transgen. Preuzeto i prilagođeno prema (Richardson i sur. 1997).

## 2. RAZVOJ TEHNOLOGIJE CRISPR/Cas9

Regije CRISPR u genomu *E. coli* otkrivene su 1987. godine kao neuobičajene palindromske ponavljajuće sekvence prekinute ne-ponavljajućim sekvencama. Iako im je funkcija tada bila nepoznata, uskoro su pronađene u gotovo 90% arheja i 40% bakterija što je ukazalo na određeni biološki značaj sekvenca. Set gena asociran s lokusom CRISPR otkriven je 2002. godine, ali je njihova funkcija također bila nepoznata osim indikacije da su CRISPR asocirani geni (Cas) uključeni na neki način u metabolizam DNA ili ekspresiju gena. Ne-ponavljajuće sekvence u regijama CRISPR analizirane su čime je utvrđeno njihovo originalno porijeklo iz kromosomske molekule DNA bakteriofaga, virusa koji inficira bakterije. Bakterije koje su u genomskim regijama imale sekvence CRISPR određenih sojeva bakteriofaga, nazvanih razmaknicama (eng. *spacers*), pokazivale su posebnu vrstu „imunosti“ na iste (Lino i sur. 2018). Regija CRISPR djeluje kao vrsta stečene imunosti ugrađujući palindromske sekvence patogena u genom bakterije koje kasnije

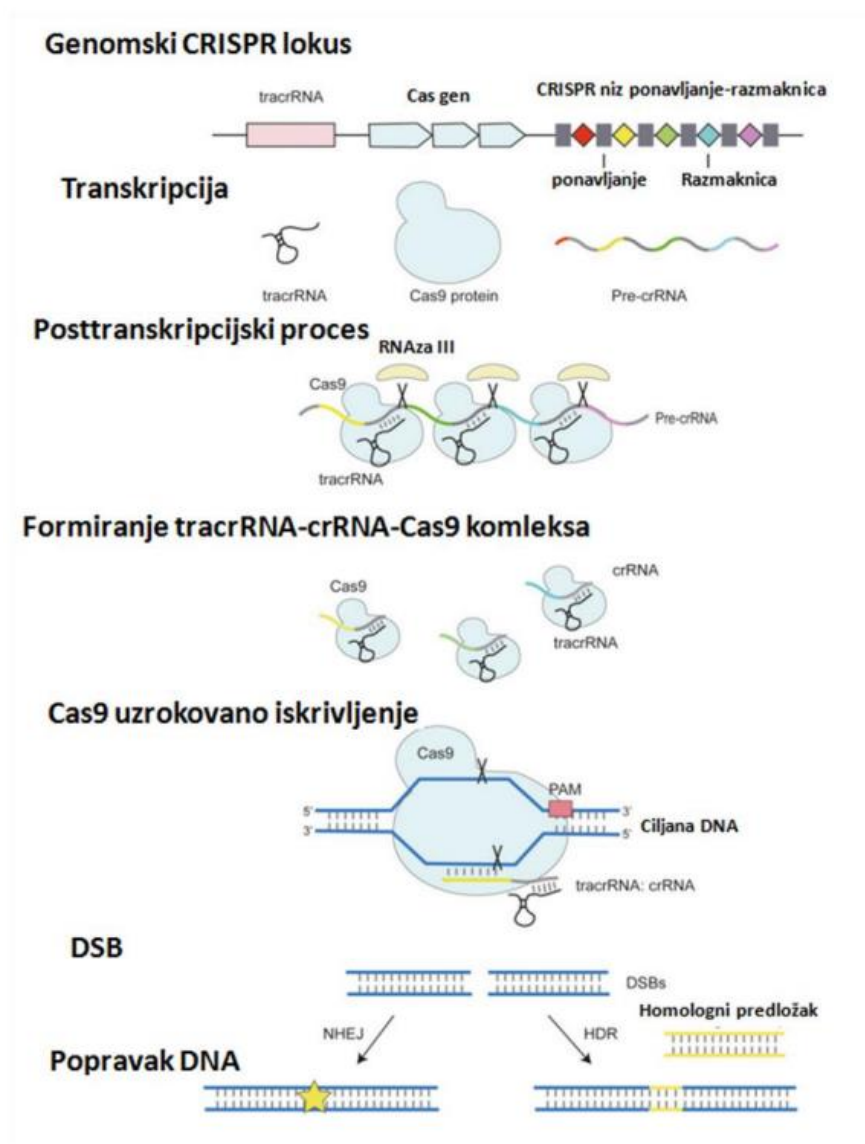
koristi endonukleaza Cas. Lokus CRISPR u bakterijama sastoji se od 3 komponente, transaktivirajuće CRISPR RNA, tracrRNA, gena Cas koji se transkribira u protein Cas9 s endonukleaznom aktivnošću i sekvenci CRISPR koje se transkribiraju u prekursorske CRISPR RNA, pre-crRNA. TracrRNA i pre-crRNA stabiliziraju se pomoću proteina Cas9 na način da se tracrRNA veže za palindromske sekvence pri čemu dolazi do sparivanja njihovih baza. RNaza III obrađuje pre-crRNA u crRNA izrezujući razmaknice te se crRNA ponaša kao vodič za Cas9 kako bi prepoznala virusnu DNA na temelju komplementarnosti i razgradila ju izrezivanjem stvarajući dvostruke lomove DNA pomoću endonukleazne aktivnosti proteina Cas9.

## 2.1. MEHANIZAM DJELOVANJA SUSTAVA CRISPR/Cas9

Princip djelovanja sustava CRISPR/Cas9, kao laboratorijskog alata za modifikaciju genoma, bazira se na zamjeni kompleksa crRNA i tracrRNA sintetskom kimernom navodećom molekulom RNA odnosno sgRNA (eng. *small guide RNA*). sgRNA je moguće sintetizirati s proizvoljnim slijedom nukleotida kako bi ona kao takva mogla prepoznati bilo koje ciljano mjesto u genomu navodeći Cas9 koji svojom endonukleaznom aktivnošću uvodi dvostruki lom DNA na željenom mjestu. Preciznost i aktivnost djelovanja Cas9 leži u 2 faktora: sekvenci PAM (eng. *protospacer adjacent motif*) i ciljanoj genomskoj sekvenci. Ciljana sekvenca od 20 parova baza je komplementarna molekuli sgRNA koja se s njom sparuje kako bi navela Cas9 na ciljano mjesto u genomu. Sekvence PAM su kratke (najčešće 3 pb) i relativno nespecifične sekvence. Iako ih Cas9 prepoznaje kao ciljanu sekvencu, što donekle utječe na specifičnost (primjerice ortolog SpCas9 PAM sekvenca je 5'-NGG-3' dok SaCas9 prepoznaje sekvencu 5'-NNGRRT-3') vezanja, njihovo učestalo pojavljivanje u genomu predstavljaju veliku prednost pri vezanju Cas9 za ciljani dio genoma gdje se javlja efekt učestalog vezanja Cas9 za željene regije (Ran i sur. 2013).

Cas9 sastoji se od dvije konzervirane endonukleazne domene, HNH (histidin-aspargin-histidin) i RuvC (nukleazna domena nalik Rnazi H) kojom cijepaju dDNA i uvode dvostruki lom lanaca. Nakon stvaranja dvostrukog loma DNA, stanica koristi 2 puta za popravak nastale „greške“, nehomologno spajanje krajeva (NHEJ, eng. *non-homologous end joining*) i popravak usmjeren homologijom (HDR, eng. *homology directed repair*). Mehanizam NHEJ popravljiva DNA lomove direktnom ligacijom bez potrebe za homolognim kalupom. Ovaj mehanizam sklon je insercijama i delecijama nukleotida koje često rezultiraju pomakom okvira čitanja te u konačnici inaktivacijom

gena (*knockout*). Mehanizam HDR koristi DNA kalup homologan krajevima DNA na mjestu dvostrukog loma za sintezu novih fragmenata čime se zadržava uniformnost originalnog gena te ne dolazi do potencijalnog *knockouta*. Ovaj mehanizam moguće je koristiti za ubacivanje transgena na mjesto dvostrukog loma što je redovita praksa u mnogim laboratorijima danas (Jiang i Doudna 2017) (**Slika 2.**).



**Slika 2.** Mehanizam djelovanja sustava CRISPR/Cas9 u biotehnologiji genetskog modificiranja stanica. Genomski lokus CRISPR sastoji se od lokusa CRISPR s nizom ugrađenih ponavljajućih razmaknicama, gena *Cas* i *tracrRNA*. Navedene komponente se transkribiraju formirajući *tracrRNA*, protein *Cas9* i *pre-crRNA* dok posttranskripcijskom modifikacijom se spajaju u kompleks *tracrRNA*:*crRNA*-*Cas9*. *TracrRNA*:*crRNA* kompleks navodi protein *Cas9* na specifično mjesto u genomu na temelju komplementarnosti s ciljanom sekvencom pri čemu se uvodi dvostruki lom molekule DNA pomoću *Cas9*. Dvostruki lom se može popraviti pomoću dva mehanizma: NHEJ koji ne zahtjeva

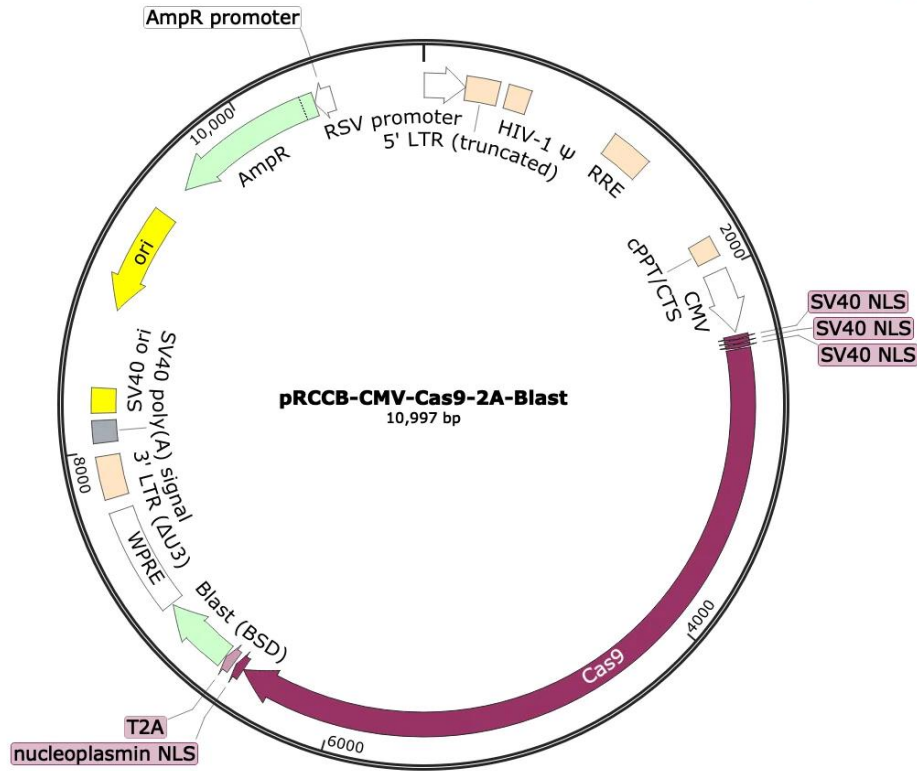
kalup i HDR koji koristi homologni predložak. Ukoliko koristimo transgen kao homologni predložak, na mjesto dvolančanog loma se može ugraditi gen od interesa. Preuzeto i prilagođeno prema Peng i sur. (2016).

## 2.2. MODIFIKACIJE SUSTAVA CRISPR/Cas9

Iako se na prvi pogled tehnologija CRISPR/Cas9 čini idealnim alatom u biotehnologiji, ona ne dolazi bez svojih nedostataka. Veliki problem predstavlja tzv. efekt off-target. Cas9 ima tendenciju promašiti ciljano sekvencu te na taj način uzrokovati dvostruki lom na nespecifičnim mjestima u genomu koja nisu u potpunosti komplementarna molekuli sgRNA. Naime, istraživanje provedeno na 124793 molekula sgRNA pokazalo je da 98,4% molekula ima barem jedno off-target mjesto vezanja te da samo oko 1,6% sgRNA ima jedinstveno, precizno mjesto vezanja (Bolukbasi i sur. 2015). Obzirom da je sustav CRISPR/Cas9 sklon pogreškama koje su nespecifične i potencijalno vode ka nasumičnim insercijama i delecijama stvara se problem u korištenju ove tehnologija u terapijske svrhe. Također, kako bi nastao dvolančani lom aktivnošću Cas9, obje endonukleazne domene moraju se prihvatiti na isto ciljano mjesto na oba lanca DNA jer u suprotnom nastaju dva jednolančana ureza ovisno o aktivnoj domeni. Stoga su bile potrebne određene modifikacije sustava kako bi se spriječio efekt off-target, a jedna od takvih mutacija je u endonukleazi Cas9 koja se kao takva označuje kao dCas9 (eng. *Deactivated, dead Cas9*). Ukoliko su endonukleazne domene mutirane na regijama D10A domene RuvC i H840A domene HNH, inaktivni dCas9 služi kao proteinska okosnica za koju se mogu fuzionirati različiti proteini poput fluorescentnih proteina, različitih proteinskih privjesaka ili proteinskih domena za specifičnu epigenetičku manipulaciju histona ili molekulu DNA bez uvođenja dvolančanog loma DNA što omogućuje precizniju gensku manipulaciju uz smanjeni efekt off-target (Tadić i sur. 2019). Modificirani dCas9 fuzioniran sa domenama za povećanje ekspresije gena (VPR) ili smanjenje ekspresije gena (KRAB, eng. *krüppel associated box*) također može služiti kao regulator ekspresije gena vezanjem na određeno mjesto u genomu, specifično ishodište transkripcije ili blokiranjem vezajućeg mjesta RNA-polimeraze (Komor i sur. 2016).

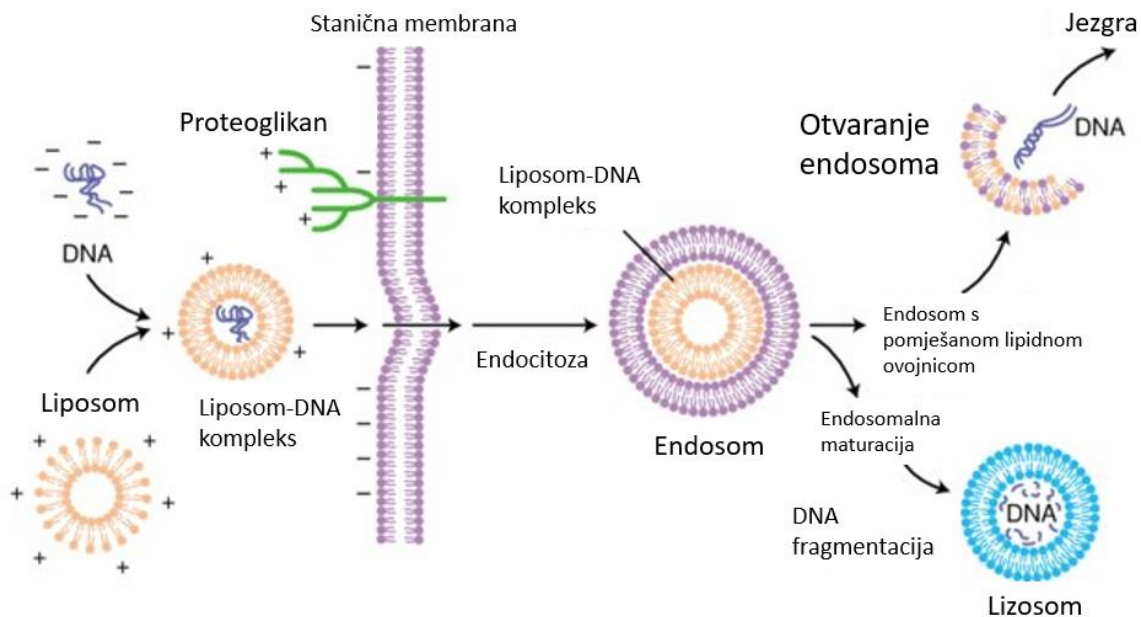
## 2.3. *In vitro* UNOSA KAZETA CRISPR/Cas9

Sustav CRISPR/Cas9 potrebno je prvenstveno unijeti u ciljano stanicu kako bi mogli modificirati genom stanice. Najčešći oblik unosa konstrukta je transfekcijom ili transdukcijom stanica kloniranog plazmida koji kodira za sve potrebne komponente CRISPR/Cas9 koje se eksprimiraju u ciljanoj stanici tranzijentno ili stabilno (**Slika 3.**).



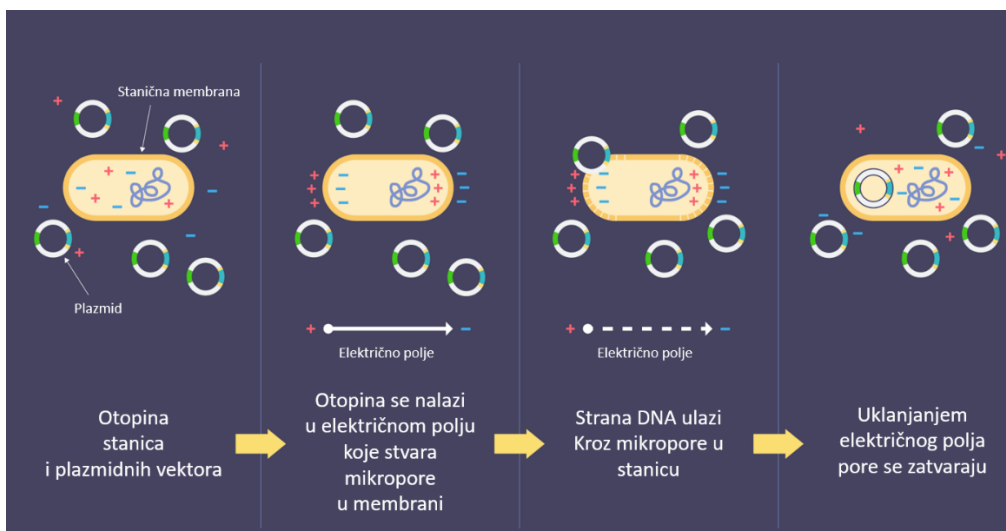
**Slika 3.** Prikaz klasičnog konstrukta CRISPR/Cas9. Prikazane su ključne komponente regije 3' LTR i 5' LTR koje omogućuju stabilnu integraciju kazete u genom, gen za endonukleazu Cas9 s nuklearnim lokalizacijskim signalom (NLS) koji će ga navesti u jezgru stanice te dodatna rezistencija na antibiotik ampicilin (Amp) i blasticiditn (Blast) za selekciju uspješno transfeciranih stanica. Preuzeto i prilagođeno prema “CRISPR Cas9 Expression Construct | Collecta, Inc – Collecta”.

Konstrukat DNA moguće je unijeti virusnim ili ne-virusnim metodama. Ne-virusne metode dijele se na kemijske i fizičke metode. Pod kemijske metode spadaju lipofekcija i transfekcija kalcijevim fosfatom, dok je najpoznatija fizička metoda elektroporacija i mikroinjektiranje. Kod lipofekcije, negativno nabijeni konstrukat DNA asociran je s pozitivno nabijenom lipidnom ovojnicom čime nastaje lipidna vezikula – liposom. Liposomi se stapaju sa staničnom membranom ciljane stanice zbog iste polarnosti te endocitozom ispuštaju konstrukat u citoplazmu koji se može ili razgraditi u citoplazmi stapanjem sa lizosomom ili prenijeti u jezgrin genom gdje se potencijalno može ugraditi ili izgubiti kroz niz staničnih dioba (Parker i sur. 2003) (**Slika 4.**).



**Slika 4.** Shematski prikaz lipofekcije stanice. Molekula DNA koja je negativno nabijena se veže sa pozitivno nabijenom lipidnom molekulom (liposom) i stvara kompleks koji ulazi endocitozom kroz staničnu membranu. Endosom se raspada ulaskom u stanicu pri čemu DNA ima dvije moguće sudbine: oslobađanje molekule DNA u jezgru ili formiranje lizosoma te razgradnja molekule DNA. Preuzeto i prilagođeno prema Parker i sur. (2003.).

Transfekcija kalcijevim fosfatom bazira se na otopini konstrukta DNA i kalcijevog fosfata koji kondenzira molekulu DNA. Ovakva kondenzirana molekula može endocitozom ući u stanicu gdje se vraća u prvobitno stanje. Ovo je jedna od najstarijih metoda unosa molekule DNA u stanicu, ali njen nedostatak je visoka citotoksičnost koja predstavlja problem kod transfekcije u osjetljivim kulturama stanica (Kwon i Firestein 2013). Stoga se često koriste fizičke metode poput elektroporacije koja je danas u širokoj primjeni. Stanice se izlažu električnom polju koje uzrokuje mikroskopske nestabilnosti u staničnoj membrani što rezultira nastankom sitnih pora koje služe kao pore za unos molekule DNA. Zaustavljanjem električnog polja, pore membrana se zatvaraju, a molekula DNA ostaje zarobljena u stanici. Iako je metoda relativno brza, nije vrlo efikasna i zahtjeva korištenje puno većeg broja stanica nego kod ostalih metoda, djelomično i zbog visoke letalnosti stanica koje su pod stresom uslijed izlaganja električnom polju (Potter i Heller 2003) (**Slika 5.**).



**Slika 5.** Shematski prikaz elektroporacije bakterijskih stanica. Otopina plazmida i stanica se nalazi u električnom polju koje stvara mikropore na membrani koje omogućuju ulazak DNA u stanice. Uklanjanjem električnog polja se pore zatvaraju, a DNA ostaje zarobljena u stanici. Princip je jednak za elektroporaciju animalnih stanica. Preuzeto i prilagođeno prema Chicaybam i sur. (2017).

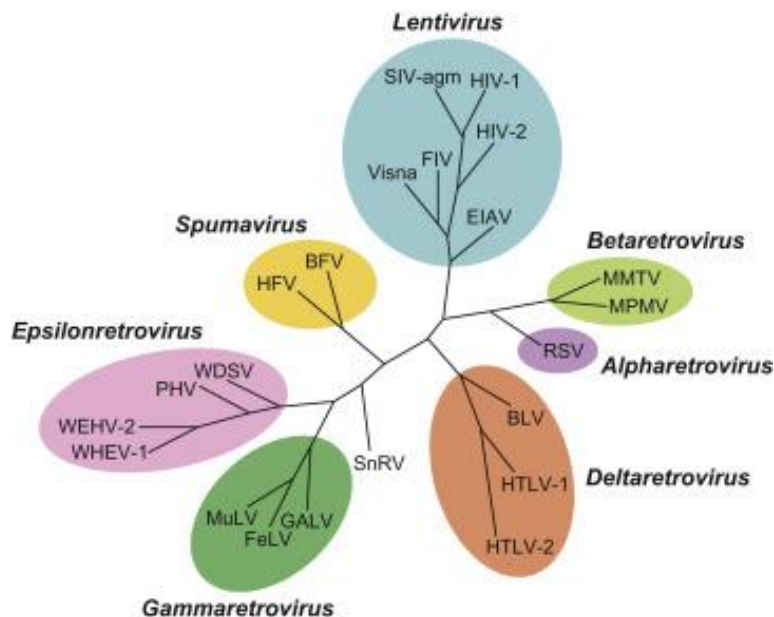
Iako su navedene metode efikasne za dostavu transgena, unos konstrukta CRISPR/Cas9 je vrlo zahtjevan i kompleksan. Glavni problem predstavlja potreba za stabilnom integracijom u ciljani genom koja je neizvediva navedenim metodama. Drugi problem je veličina samog konstrukta (od 9 do čak 19 kb, od kojih je samo endonukleaza Cas9 veličine oko 4,2 kb) (Moon i sur. 2021). Stoga se za unos konstrukta CRISPR/Ca9 koriste virusne metode zbog mogućnosti stabilne integracije velikih konstrukta i visoke efikasnosti transdukcije. Unos virusnim putem bazira se na modificiranim virusnim česticama i korištenjem endogenih mehanizama infekcije stanica. Bitna karakteristika ovih izmijenjenih virusa je replikacijski deficit, odnosno izostanak virusnih elemenata koji bi omogućili replikaciju u stanici i reaktivaciju virusa koja bi dovela do klasičnih simptoma virusne infekcije te u konačnici vodili apoptozi. Tri su glavne skupine virusa koji se koriste u ove svrhe: lentivirusi, adenovirusi te adeno-asocirani virusi (AAV). Adenovirusi su poznati po velikom kapacitetu pakiranja i dostave strane DNA do čak 36 kb te visokoj efikasnosti transdukcije kod stanica koje se dijele i onih koje se ne dijele poput neurona ili hepatocita no veliki nedostatak je da nemaju sposobnost stabilne integracije te često uzrokuju snažan upalni i imunski odgovor kod životinjskih modela. Adeno-asocirani virusi imaju manji kapacitet pakiranja, ali uzrokuju vrlo slabi imunski odgovor i mogućnost infekcije gotovo svih tipova stanica neovisno o stadiju diobe. Različiti serotipovi pokazuju specifičan tropizam prema



određenim tipovima stanica (primjerice serotip AAV2 preferira stanice skeletnih mišića, hepatocite i stanice mrežnice) što ih čini obećavajućim alatom u genskoj terapiji. Kako ove dvije skupine virusa nemaju mogućnost stabilne integracije u genom i/ili pakiranju velikih transgena, uvodi se potreba za trećom skupinom virusa, lentivirusa koji imaju mogućnost stabilne inkorporacije transgena u genom stanice domaćina u većem kapacitetu od virusa AAV (Chong i sur. 2021).

### 3. PORODICA VIRUSA *Retroviridae*

Porodica virusa *Retroviridae* su ssRNA (eng. *single strand RNA*) virusi koji koriste reverznu transkriptazu kako bi se replicirali preko DNA intermedijera u stanici domaćina. Enzim reverzna transkriptaza omogućuje reverznu transkripciju molekule ssRNA u komplementarnu molekulu cDNA (eng. *complementary DNA*) koja se ugrađuje u genom stanice domaćina pomoću enzima integraze. Ugrađena DNA naziva se još i provirus, a inficirana stanica ne raspoznaje virusnu DNA od genomske, te ju transkribira i sukladno tome translatira u proteine zajedno sa svojim genima što u konačnici vodi ka sastavljanju novih virusnih kopija (Carter i Saunders 2007). Retrovirusi su podijeljeni u 3 osnovne skupine (**Slika 6.**): onkoretrovirusi, lentivirusi i spumavirusi. Onkoretrovirusi se danas smatraju zastarjelom podjelom te se ova skupina dodatno dijeli na alfaretroviruse, betaretroviruse, gamaretroviruse, deltaretroviruse i epsilontetroviruse. Onkoretrovirusi, kako im samo ime govori, uzrokuju rak. Primjer je humani T-limfotropni virus (HTLV) koji je uzročnik jednog od oblika leukemije kod ljudi. Lentivirusi, od kojih su najpoznatiji virus humane imunodeficijencije prvog i drugog tipa (HIV-1 i HIV-2), uzrok su kroničnih, često smrtonosnih bolesti s karakterističnim dugim inkubacijskim periodima. Spumavirusi, s druge strane nisu povezani s nikakvim patološkim stanjima kod ljudi i životinja (Coffin i sur. 2021).



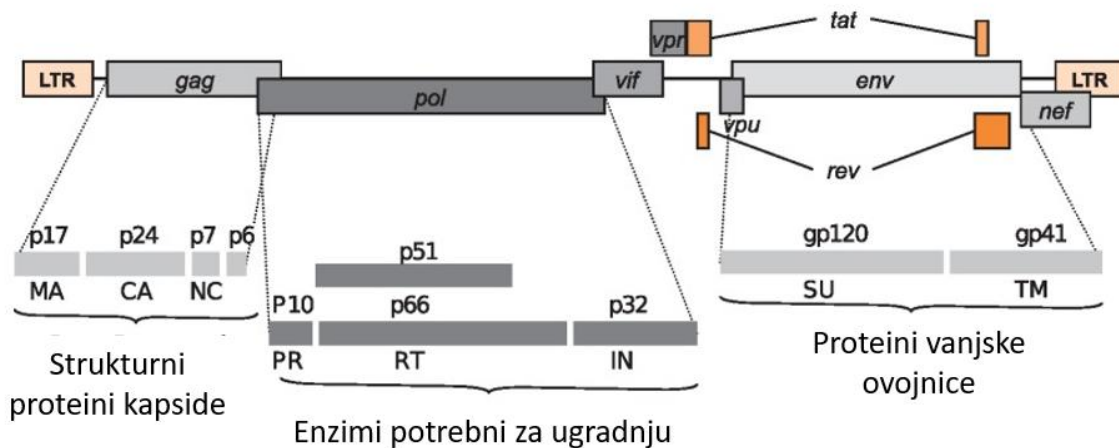
**Slika 6.** Podjela porodice *Retroviridae* na skupine *Lentivirus*, *Spumavirus*, *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus* i *Epsilonretrovirus*, Preuzeto iz (MacLachlan i sur. 2016).

### 3.1. GRAĐA I STRUKTURA GENOMA VIRUSA HIV

Lentivirusi i gamaretrovirusi najčešće su korišteni kao vektori unosa stranih transgena u biotehnologiji. Razlika ove dvije skupine je što, za razliku od lentivirusne RNA, gamaretrovirusna RNA ne može proći kroz membranu jezgre što onemogućuje infekciju stanica koje se ne dijele (Cooray i sur. 2012). Najpoznatiji predstavnik skupine lentivirusa je HIV čiji je genom građen od 2 jednolančane molekule RNA vezane za nukleokapsidne proteine. Oko genoma nalazi se proteinska ovojnica kapsida. Virus je okružen lipidnim dvoslojem povezan proteinima matriksa s kapsidom što čini ovojnicu virusa. Kako ovojnica nastaje procesom pupanja virusa iz stanice domaćina, ona sadrži i dijelove stanične membrane domaćina kao i proteine koji dolaze s njom. Osim proteina domaćina, ovojnica sadrži i virusne proteine koji strše s površine i nazivaju se proteini šiljci ili *spike* proteini. Njihova uloga je da prepoznaju stanice domaćina i specifično vežu virus za membranu što je ključan faktor inicijacije njihove virulencije. Cjelokupni genom, a sukladno tome i svi geni koji kodiraju za pojedinačne proteine virusa HIV-a, vrlo je dobro proučen (German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut) 2016).

Duljina molekule ssRNA je oko 10 kb zajedno s 5' kapom i poli-A repom. Genom svih retrovirusa organiziran je u 3 glavne regije: *gag*, *pol* i *env*. Regija *gag* (eng. *group-specific antigen*), kodira za proteine unutarnje strukture retrovirusa. Translatira se u prekursorski poliprotein koji

cijepanjem daje 3 glavna proteina: *matrix* (MA) vezan za membranu, *capsid* (CA) - protein kapside te *nucleic-acid-binding* (NC) - protein koji se veže za virusnu RNA i tvori nukleokapsidu. Reverzna transkriptaza je ključan enzim u replikacijskom ciklusu retrovirusa, a kodirana je genom *pol*. Ovaj gen kodira i za enzim integrazu koja integrira dvolančanu molekulu DNA virusa u genom domaćina. Dodatno, kodira i za protein proteazu koja nastaje kao poliproteinski produkt translatairana sa genomskog bloka *gag* i *pol*. Ovojnica retrovirusa, osim dijelova stanične membrane domaćina sadrži i 2 virusna proteina za koje kodira gen *env*. Površinski protein kodiran genom *surface* (SU) veći je i ima ulogu receptora koji prepoznaje specifične proteine domaćina, a nalazi se na površini virusne čestice, dok je manji protein kodiran genom *transmembrane* potreban za fuziju virusa sa stanicom domaćina (Turner i Summers 1999). Osim 3 glavna gena, lentivirusi imaju još 7 dodatnih pomoćničkih gena: *tat* i *rev* koji kodiraju za regulatorne proteine te *nef*, *vif*, *vpu*, *vpr* i *vpx* koji kodiraju za pomoćne proteine čija je uloga regulacija i koordinacija virusne ekspresije i izbjegavanja imunološkog odgovora domaćina (Slika 7.).

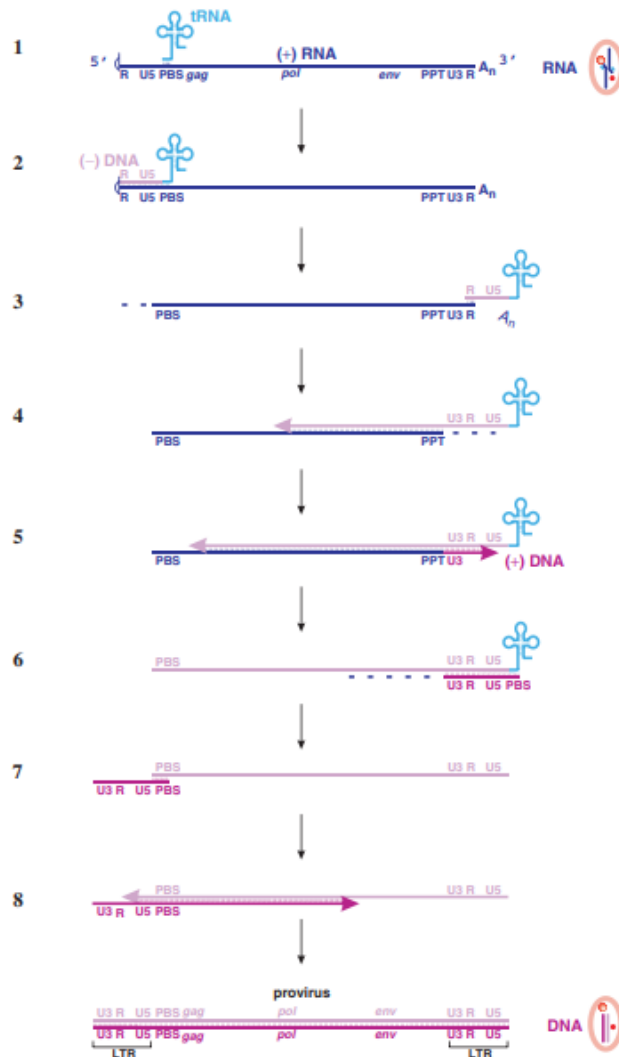


**Slika 7.** Organizacija genoma virusa HIV. Prikazane su 3 glavne skupine gena *gag*, *pol* i *env*, kao i dodatni pomoćni proteini. Geni *gag* kodiraju za strukturne proteine kapside, *pol* za enzime potrebne za ugradnju u genom domaćina poput reverzne transkriptaze (RT), proteaze (PR) i integraze (IN), dok *env* kodira za proteine vanjske ovojnice virusa. Genom je omeđen s dvije regije LTR koje su ključne pri replikaciji, integraciji i korištenju virusa kao vektora.

Preuzeto i prilagođeno prema (Aboulaflia i sur. 2006).

Regulatorni proteini REV i TAT jedini su od 7 dodatnih proteina esencijalni za replikaciju HIV-a. Ugradnjom virusnog genoma u genom domaćina, formiraju se dva kraja provirusa nazvanih regijama LTR (eng. *long terminal repeats*) podijeljene u 3 podregije: U3, R i U5. Regija LTR nalazi se na 5' kraju i služi kao promotor retroviralnog genoma, dok LTR na 3' kraju kodira za

protein NEF. Gen *tat* i proteini za koje kodira su transkripcijski transaktivatori 5' promotorske regije LTR. Nizvodno od mjesta inicijacije transkripcije nalazi se regija TAR koja je zapravo RNA slijed koji tvori omču odnosno *stem loop*. Proteini TAT vežu se za ovu regiju i reguliraju transkripciju provirusnog genoma. Vežanjem proteina TAT na ovu regiju drastično se pojačava stopa transkripcije svih HIV gena pozitivnom povratnom spregom što doprinosi eksponencijalnom umnažanju i stvaranju novih kopija virusa. Kod nedostatka gena *tat* transkripcija je iznimno neefikasna i završava prerano što onemogućuje stabilno umnažanje u stanici domaćina (Ruben i sur. 1989). Gen *rev* kodira za protein koji se veže za slijed RRE (eng. *Rev-responsive element*). Transkripcijom provirusne DNA nastaje transkript mRNA koji zbog specifičnih regija ne može napustiti jezgru kako bi se translatirao u citoplazmi. Protein REV vežanjem na slijed RRE omogućuje izlazak molekule mRNA u citoplazmu te je bez njegove aktivnosti ekspresija proteinskih dijelova virusa blokirana (Pollard i Malim 1998) (**Slika 8.**). Proces infekcije stanice započinje prepoznavanjem površinskih molekula virusa te stapanjem virusne čestice i stanice domaćina. U stanicu ulazi kapsida s RNA virusnim genomom koji je vezan za okolne proteine. Prva uloga reverzne transkriptaze je da molekulu RNA oslobodi od navedenih proteina nakon čega kreće proces reverzne transkripcije u molekulu cDNA. Zatim se sintetizira komplementarni lanac cDNA te nastaje dvolančana molekula DNA koja putuje u jezgru. Enzim integraza potom ugrađuje dvolančanu molekulu DNA u genom domaćina vezujući se za regije LTR koje su naknadno sintetizirane te nakraju endonukleaznom aktivnošću cijepa dinukleotid ili trinukleotid s oba 3' kraja molekule pri čemu nastaju 3' OH krajevi koji napadaju fosfodisetersku vezu u genomu domaćina, a 5' stršeći krajevi uklanjaju se staničnim enzimima. Na ovaj način virusni genom se uspješno inkorporira u genom domaćina te tvori ranije spomenuti provirus (Craigie 2012).



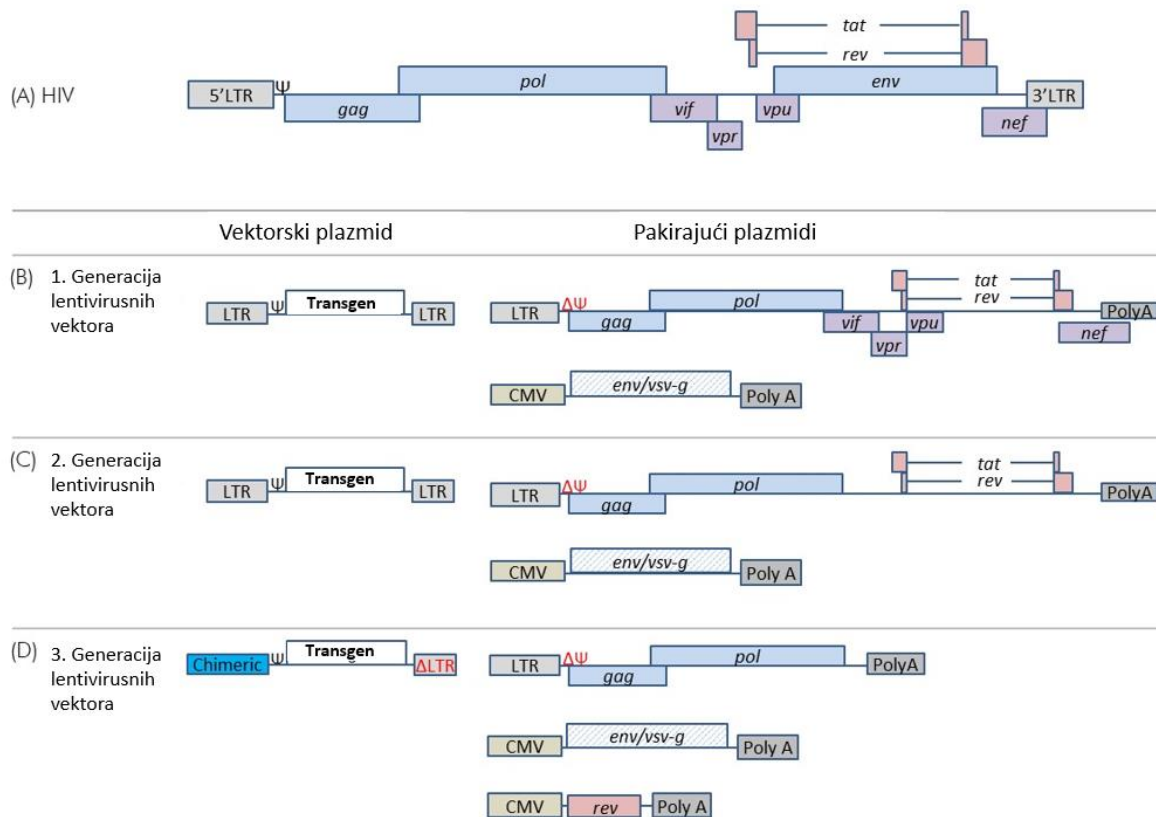
**Slika 8.** Proces reverzne transkripcija u stanici domaćina. Na sekvencu PBS je vezana molekula tRNA (1) na čijem 3' kraju započinje sinteza cDNA (2). Rnaza H razgrađuje RNA sa RNA-DNA dupleksa, a mala molekula cDNA veže se za 3' kraj druge kopije virusnog genoma (3). Molekula cDNA elongira se dok Rnaza H simultano razgrađuje RNA kalup od 3' kraja (4). Zapoinje sinteza drugog lanca molekule DNA (5) dok se sva preostala RNA razgrađuje (6). Drugi lanac DNA otpušta se sa 5' kraja prvog lanca DNA i prihvaća se na 3' kraj (7) čime je završena sinteza oba lanca (8). Preuzeto iz (Carter i Saunders 2007).

### 3.2. RAZVOJ LENTIVIRUSNE TEHNOLOGIJE

Kako bi se lentivirus mogao koristiti kao vektor u genskoj terapiji za unos nekog gena u stanice *in vitro* ili *in vivo* potrebno je sintetizirati replikacijski defektne virusne čestice s upakiranim proizvoljnim genskim materijalom. Za sintezu se koriste tzv. pakirajuće stanice koje eksprimiraju

sve potrebne genske komponente virusnog vektora. Tip stanica koji se najviše koristi za proizvodnju virusnih čestica s upakiranim transgenom su embrionalne stanice linije bubrega HEK293 s ugrađenim antigenom T virusa SV40 (HEK293T) (eng. *human embryonic kidney*). Stanična kultura prvotno je kotransfecirana s 3 do 4 plazmida koji kodiraju za osnovne genomske komponente virusa kao i transgen od interesa. Ovakav sustav razdvajanja virusnih gena na više plazmida razvijen je iz sigurnosnih razloga kako bi se onemogućila rekombinacija prilikom ugradnje plazmida u genom stanica HEK293T čime bi se aktivirala sposobnost replikacije virusa u stanici. Postoje 3 razine sigurnosti s obzirom na podjelu po plazmidima koji se koriste u kotransfekciji kod proizvodnje virusnih čestica. Kod prve razine sigurnosti virusni proteini sintetiziraju se prolazom transfekcijom sa 3 plazmida: pakirajući plazmid sa svim ključnim HIV genima uključujući i pomoćne *vif*, *vpr*, *vpu* i *nef* osim gena *env*, plazmid s genom za proteine vanjske ovojnice dobiven iz vezikularnog stomatitis virusa (VSV) koji kodira za glikoprotein ovojnice G te plazmid s transgenom koji želimo upakirati u virusne čestice. Ovakva podjela omogućuje stvaranje replikacijski kompetentnih virusa uz minimalno 2 rekombinacije, dok dodatnu mjeru sigurnosti uspostavljamo korištenjem gena VSVG *env* koji nema homolognih sljedova koji bi mogli rekombinirati s ostalim HIV genima. Druga generacija lentivirusnih vektora i dalje je podijeljena na 3 plazmida, ali nova mjera sigurnosti je eliminacija pomoćnih HIV gena (*vif*, *vpu*, *vpr* i *nef*) iz pakirajućeg plazmida. Ovom modifikacijom ne mijenja se titar virusa niti sposobnost transdukcije, dok je sigurnost povećana jer navedeni geni kodiraju za faktore virulencije klasičnog virusa HIV. Treća generacija daleko je najsigurnija. Problem kod prethodne dvije generacije može predstavljati naknadna infekcija divljim tipom virusa koji potencijalno može aktivirati integrirani vektorski virus te ga reaktivirati u stanicama. Unutar regija LTR nalaze se ranije spomenute regije U3, R i U5 koje djeluju kao promotori koji bi ugrađivanjem ispred protoonkogeni mogli aktivirati onkogenezu. Ovi elementi nisu u početku prisutni na oba kraja standardnog vektora, već se pri reverznoj transkripciji regija U3 s 3' LTR kraja kopira na 5' LTR kraj, a regija U5 se s 5' LTR kraja kopira na 3' LTR kraj. Delecijom U3 regije s 3' LTR kraja onemogućuje se njena replikacija što rezultira vektorom bez promotorske regije. Ovakvi vektori nazivaju se SIN (eng. *self-inactivating*) jer im je onemogućena aktivacija drugih staničnih gena promotorskom aktivnošću regija U3 krajeva LTR (Delenda i Iii 2004). Na ovaj način, modifikacijom genoma HIV-a, odnosno stavljanjem konstitutivnog promotora uzvodno od transkripta od interesa, uklanja se potreba za genom *tat*. Proizvedeni vektor ima duge ponavljajuće

sljedove na svojim krajevima koji omogućavaju visoku efikasnost rada neovisno o regulatornom genu *tat*, dok gen *rev* može komplementarno nadopuniti aktivnost gena *gag* i *pol* tako da se kodira s drugog plazmida umjesto da je preklapajući dio sekvence *gag-pol*. Ovakva modifikacija lentiviralnog sustava HIV zove se treća generacija lentiviralnog pakiranja (**Slika 9**).



**Slika 9.** Pregled i usporedba sigurnosnih generacija lentivirusnih vektora. Prikazan je genom klasičnog virusa HIV (A). U prvoj generaciji lentivirusnih vektora (B), genom je podijeljen na 3 plazmida od kojih jedan sadrži transgen, a dva su plazmida pakirajuća od kojih jedan sadrži gen *env* porijeklom iz vezikularnog stomatitis virusa (VSV), a drugi *gag* i *pol* i sve pomoćničke gene. Kod druge generacije (C) uklonjeni su dodatni geni *vif*, *vpr*, *vpu* i *nef*. Treća i najsigurnija generacija uvodi četvrti plazmid s odvojenim genom *rev* dok su geni *gag* i *pol* kodirani s istog plazmida te komplementiraju genu *rev* bez transaktivatora. Uklonjena je i regija U3 s krajeva LTR. Preuzeto i prilagođeno prema (Canadian Biosafety Guideline: Lentiviral Vectors)

Lentivirusni vektori mogu se proizvoditi u manjim količinama ili u većim količinama u bioreaktorima iz suspenzijskih kultura u biotehnološkim pogonima. Proizvodnja u manjim laboratorijima temelji se na kemijskoj transfekciji, najčešće adherentnih stanica, potrebnim plazmidima, a metoda transfekcije je uglavnom transfekcija kalcijevim fosfatom koja je ranije opisana, no moguća je i lipotransfekcija. Vektori se mogu proizvoditi u stanicama koje su prolazno

transfecirane, ali i u stabilnim transfeciranim kulturama. Stabilne kulture puno su efikasnije kod vektora koji se koriste u genskoj terapiji zbog veće konzistencije, a time i veće sigurnosti kako ne bi došlo do neočekivanih promjena pri sklapanju virusnih čestica (Merten i sur. 2016).

#### 4. UNOS LENTIVIRUSNIH KONSTRUKATA U *in vivo* I *in vitro* MODELE

Proces transdukcije *in vitro*, jest infekcija stanica novoprodučenim lentivirusnim česticama s upakiranim konstruktom od interesa proizvedenim u stanicama HEK293T. Transdukcija započinje pripremom stanica u kulturi koje se trebaju inficirati. One se nasađuju na pločice s 24 jažice, tipično 24 h prije izlaganja lentivirusima. Stanice se nasađuju u koncentraciji od  $6-8 \times 10^4$  stanica u ukupnom volumenu od 1 mL. U slučaju korištenja drugačijih volumena važno je da su stanice nasađene u gustoći od 30 do 40%. Stanice se inkubiraju preko noći u klasičnim uvjetima rasta. Nakon inkubacije, potrebno je tretirati stanice kako bi se povećala receptivnost prema virusnim česticama. Tipično se za ovaj korak priprema otopina polibrena sa staničnim medijem, čija je uloga neutralizacija negativnih naboja virusne čestice kako bi se olakšala infekcija stanica čija je površina također negativno nabijena. Infekcija se provodi klasičnom transfekcijom, odnosno izlaganjem stanica lentivirusnim vektorima koji se dodaju u stanični medij. Prilikom izvođenja eksperimenta potrebno je imati negativnu kontrolu sa neinficiranim stanicama, pozitivnu kontrolu s protein GFP lentivirusnim vektorom i negativnu lentivirusnu kontrolu. Inkubacija traje 24 h nakon čega se obustavlja sinteza virusa uklanjanjem medija s virusnim česticama dodatkom svježeg medija. Lentivirusni vektori nose, osim transgena, i selektivne markere kao što su geni za fluorescirajuće proteine (najčešće GFP) ili gene za antibiotsku rezistenciju. Nakon selekcije stanica koje su uspješno lentivirusnom transdukcijom primile transgen, provodi se analiza ekspresije gena kako bi se utvrdila funkcionalnost i utjecaj na stanice koje su modificirane. Tipični načini analize ekspresije gena su qPCR (eng. *quantitative polymerase chain reaction*) za kvantifikaciju ciljane sekvence DNA u transduciranim stanicama, metoda Western blot za detekciju specifičnih proteina te imunofluorescencija za detekciju ciljanih eksprimiranih proteina fluorescentno obilježenim antitijelima (Horn i sur. 2004).



Lentivirusnoj transdukciji *in vivo* prethodi kloniranje vektora kao i za metodu *in vitro*. Razlika je u načinu dostave virusa, koja se u ovom slučaju najčešće provodi intravenskom ili intramuskularnom injekcijom, injekcijom u cerebrospinalni fluid ili direktno u ciljano tkivo. Ovakva sofisticirana metoda ima potencijal revolucionarizacije genske terapije i biomedicinskih istraživanja jer omogućuje dostavu transgena direktno u ciljano tkivo živih organizama bez potrebe za većim invazivnim zahvatima. U kombinaciji s tehnologijom CRISPR/Cas9, lentivirusni vektori mogu dostaviti funkcionalni gen i ugraditi ga na mjesto nefunkcionalnog gena koji uzrokuje određeni poremećaj. Stabilna integracija transgena, kao i stabilnost ekspresije, omogućila bi potencijalno dugoročno terapijsko rješenje (White i sur. 2017). Na primjeru nasljedne genetske bolesti, teške kombinirane imunodeficijencije (SCID, eng. *severe combined immunodeficiency*), proveden je prvi uspješan pokušaj genske terapije 1990. godine. Lentivirusna dostava funkcionalne kopije gena za enzim adenozin deaminazu (ADA) bijelim krvnim stanicama, te njihovo reiniciranje u tijelo pacijenta, rezultirali su normalnom ekspresijom enzima i sukladno tome, korekcijom deficijencije bez potrebe za transplantacijom koštane srži. (Fischer i sur. 2002). Uspješan primjer genske terapije na primjeru iste bolesti 2000. godine, zaustavljen je nakon što je 2 od 10 pacijenata razvilo oblik leukemije ugradnjom transgena u blizini onkogeno. Potencijalna nasumična ugradnja u genom predstavlja niz problema u kliničkim istraživanjima (Cavazzana-Calvo i Fischer 2007). Rješenje u ovakvim specifičnim situacijama bi bilo precizno genomsko uređivanje tehnologijom CRISPR/Cas9 za ciljanu ugradnju u genom. Iako su u zadnjim godinama postignuti ozbiljni napredci u razvoju ove metode, problem i dalje predstavlja efekt off-target.

Lentivirusna transdukcija primjenjiva je na stanicama koje se dijele, kao i na onima koje se ne dijele. Klasični primjer stanica koje se dijele su tumorske stanice. Kao jedan od osnovnih modela, ljudske i animalne tumorske stanice često se transduciraju lentivirusnim vektorima u istraživanjima metaboličkih puteva karcinogeneze, rezistencije na lijekove i potencijalnih terapeutika. Genska terapija nastoji tehnologijom CRISPR/Cas9 inhibirati rast tumora modifikacijom ključnih onkogeno ili povećanjem osjetljivosti na kemoterapeutike (Indraccolo i sur. 2002). Još jedan primjer stanica koje se aktivno dijele su matične stanice, najčešće hematopoetske i mezenhimalne. Njihova modifikacija koristi se u genskoj terapiji i regenerativnoj medicini zbog visoke sposobnosti proliferacije i diferencijacije u ciljane tipove stanica koji zbog raznih genetskih poremećaja mogu biti defektni (Kallifatidis i sur. 2008). Stanice imunskog sustava modificiraju se u svrhe imunoterapije i istraživanja imunskih odgovora organizma.

Tipično su to T i B-limfociti, ali istraživanja se provode i na ostalim tipovima. Primjer genske terapije na bijelim krvnim stanicama je ranije opisana tretiranjem teške kombinirane imunodeficijencije. Još jedan takav primjer je CAR (eng. *chimeric antigen receptor*) terapija T-limfocitima. Ova metoda koristi genetsku modifikaciju T-limfocita lentivirusnim vektorima kako bi ciljano napali tumorske stanice (Anastasov i sur. 2009).

Jedna od karakteristika stanica koje se ne dijele jest slab afinitet za primanje transgena. Ovakve stanice ne prolaze kroz aktivan stanični ciklus što rezultira iznimno slabom mogućnosti transfekcije klasičnim metodama. Iako manje efikasna nego kod stanica koje se dijele, transdukcija lentivirusnim vektorima pokazala se efektivnim načinom dostave transgena u ovakve stanice. Na primjeru neurona centralnog živčanog sustava, koji su poznati po slaboj sposobnosti regeneracije, istraživanja su fokusirana na analizu genetskih faktora koji utječu na razvoj bolesti kao što su Parkinsonova bolest. Razumijevanje čimbenika nastanka ovakvih bolesti otvara put prema genskoj terapiji dostavom funkcionalnih gena *in vivo* (Osten i sur. 2006). Kardiomiociti odnosno srčane mišićne stanice, posebno su interesantne zbog kardiovaskularnih bolesti koje su jedan od vodećih uzročnika smrti u svijetu (Gaidai i sur. 2023). Razumijevanje genetskih predispozicija za ove bolesti prvi je korak prema stvaranju novih terapeutika, kao i za izdvajanje vanjskih čimbenika i prepoznavanja njihovih utjecaja na progresiju patoloških stanja te se genska terapija treba ujedno više fokusirati na nasljedne metaboličke poremećaje kao što su hemofilija tipa A (Milani i sur. 2022).

## 5. ZAKLJUČAK

Modelni organizmi postali su nezamjenjiv alat u modernoj biologiji. Većina spoznaja o mehanizmima koji vode ka patološkim stanjima u čovjeka, ali i općenito procesu razvoja i evolucije čovjeka dolazi iz proučavanja na raznim modelima koji, iako nekad potpuno različiti, dijele mnoge karakteristike i fiziološke procese s čovjekom. Od otkrića prvih gena do potpunog sekvenciranja genoma čovjeka, došlo je do iznimnog znanstvenog napredka, a razvoj novih modernih metoda i tehnologija omogućuju daljnja još dublja molekularna istraživanja. Manipulacijom genetičkog materijala uvode se nove osobine u modelne organizme koji se koriste za još detaljnija istraživanja bioloških procesa u biomedicinske svrhe. Otkrićem i adaptacijom tehnologije CRISPR/Cas9 kao jednim od najnaprednijih alata u molekularnoj biologiji, otkriva se gotovo neograničen potencijal

proučavanja genoma živih organizama. Uz očekivana etička pitanja, ova tehnologija ubrzo je postala, kao i modelni organizmi, ključan aspekt u manipulaciji i genetičkom inženjerstvu. Glavni cilj razvoj je novih genskih terapija u svrhu razvoja novih pametnih lijekova i novih personaliziranih strategija liječenja. Tehnologija CRISPR/Cas9 danas se kombinira s tehnologijom koja koristi lentiviruse za unos i stabilnu integraciju transgena u sustave *in vitro* (stanice) i *in vivo* (organizme). Kombinacija ovih metoda omogućiti će u budućnosti bolje razvoj genske terapije ali će i unaprijediti istraživanja u području molekularne biologije, biomedicine i medicine.

## 6. LITERATURA

- Aboulafia D.M., Ratner L., Miles S.A., Harrington W.J. (2006): Antiviral and immunomodulatory treatment for AIDS-related primary central nervous system lymphoma: AIDS malignancies consortium pilot study 019. *Clin Lymphoma Myeloma* **6**: 399–402.
- Anastasov N., Klier M., Koch I., Angermeier D., Höfler H., Fend F., Quintanilla-Martinez L. (2009): Efficient shRNA delivery into B and T lymphoma cells using lentiviral vector-mediated transfer. *J Hematop* **2**: 9–19.
- Ankeny R.A., Leonelli S. (2011): What’s so special about model organisms? *Studies in History and Philosophy of Science Part A* **42**: 313–323.
- Bolukbasi M.F., Gupta A., Wolfe S.A. (2015): Creating and evaluating accurate CRISPR-Cas9 scalpels for genomic surgery. *Nat Methods* **13**: 41–50.
- Carter J.B., Saunders V.A. (2007): *Virology : principles and applications*. John Wiley & Sons Ltd, England. **358** <<https://books.google.com/books/about/Virology.html?id=EKRgZCdr-74C>>.
- Cavazzana-Calvo M., Fischer A. (2007): Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *Journal of Clinical Investigation* **117**: 1456.
- Chicaybam L., Barcelos C., Peixoto B., Carneiro M., Limia C.G., Redondo P., Lira C., Paraguassú-Braga F., Vasconcelos Z.F.M. De, Barros L., Bonamino M.H. (2017): An efficient electroporation protocol for the genetic modification of mammalian cells. *Front Bioeng Biotechnol* **4**.
- Chong Z.X., Yeap S.K., Ho W.Y. (2021): Transfection types, methods and strategies: A technical review. *PeerJ* **9**.
- Coffin J., Blomberg J., Fan H., Gifford R., Hatzioannou T., Lindemann D., Mayer J., Stoye J., Tristem M., Johnson W. (2021): ICTV virus taxonomy profile: retroviridae 2021. *J Gen Virol* **102**.
- Cooray S., Howe S.J., Thrasher A.J. (2012): Retrovirus and lentivirus vector design and methods of cell conditioning. *Methods Enzymol* **507**: 29–57.
- Craigie R. (2012): The molecular biology of HIV integrase. *Future Virol* **7**: 679.
- Day C.P., Carter J., Ohler Z.W., Bonomi C., Meskini R. El, Martin P., Graff-Cherry C., Feigenbaum L., Tüting T., Dyke T. Van, Hollingshead M., Merlino G. (2014): “Glowing head” mice: A genetic tool enabling reliable preclinical image-based evaluation of cancers in immunocompetent allografts. *PLoS One* **9**: 109956.
- Delenda C., Iii G. (2004): Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* **6**: S125–S138.
- Fischer A., Hacein-Bey S., Cavazzana-Calvo M. (2002): Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol* **2**: 615–621.

- Gaidai O., Cao Y., Loginov S. (2023): Global cardiovascular diseases death rate prediction. *Curr Probl Cardiol* **48**: 101622.
- German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut) S. 'Assessment of P.T. by B. (2016): Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **43**: 203.
- Gurumurthy' C.B., Saunders' T.L., Ohtsuka' M. (2021): Designing and generating a mouse model: frequently asked questions. *J Biomed Res* **35**: 76.
- Hanahan D., Wagner E.F., Palmiter R.D. (2007): The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer. *Genes Dev* **21**: 2258–2270.
- Horn P.A., Keyser K.A., Peterson L.J., Neff T., Thomasson B.M., Thompson J., Kiem H.P. (2004): Efficient lentiviral gene transfer to canine repopulating cells using an overnight transduction protocol. *Blood* **103**: 3710–3716.
- Indraccolo S., Habeler W., Tisato V., Stievano L., Piovan E., Tosello V., Esposito G., Wagner R., Uberla K., Chieco-Bianchi L., Amadori A. (2002): Gene transfer in ovarian cancer cells: a comparison between retroviral and lentiviral vectors. *Cancer Res* **62**: 6099-6107
- Jiang F., Doudna J.A. (2017): CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys* **46**: 505–529.
- Kallifatidis G., Beckermann B.M., Groth A., Schubert M., Apel A., Khamidjanov A., Ryschich E., Wenger T., Wagner W., Diehlmann A., Saffrich R., Krause U., Eckstein V., Mattern J., Chai M., Schütz G., Ho A.D., Gebhard M.M., Büchler M.W., Friess H., Büchler P., Herr I. (2008): Improved lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells for therapeutic intervention in pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther* **15**: 231–240.
- Kato T., Takada S. (2017): *In vivo* and *in vitro* disease modeling with CRISPR/Cas9. *Brief Funct Genomics* **16**: 13–24.
- Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. (2016): Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**: 420.
- Kwon M., Firestein B.L. (2013): DNA transfection: calcium phosphate method. *Methods Mol Biol* **1018**: 107–110.
- Lino C.A., Harper J.C., Carney J.P., Timlin J.A. (2018): Delivering crispr: A review of the challenges and approaches. *Drug Deliv* **25**: 1234–1257.
- Liu C., Xie W., Gui C., Du Y. (2013): Pronuclear microinjection and oviduct transfer procedures for transgenic mouse production. *Methods Mol Biol* **1027**: 217–232.
- MacLachlan N.J., Dubovi E.J., Barthold S.W., Swayne D.E., Winton J.R. (2016). *Fenner's veterinary virology: Fifth edition*, Elsevier Inc.  
<<http://www.sciencedirect.com:5070/book/9780128009468/fenners-veterinary-virology>>.
- Merten O.W., Hebben M., Bovolenta C. (2016): Production of lentiviral vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev* **3**: 16017.

- Milani M., Canepari C., Liu T., Biffi M., Russo F., Plati T., Curto R., Patarroyo-White S., Drager D., Visigalli I., Brombin C., Albertini P., Follenzi A., Ayuso E., Mueller C., Annoni A., Naldini L., Cantore A. (2022): Liver-directed lentiviral gene therapy corrects hemophilia A mice and achieves normal-range factor VIII activity in non-human primates. *Nat Comm* **13**: 1–14.
- Moon S., An J.Y., Choi Y.J., Oh Y.L., Ro H.S., Ryu H. (2021): Construction of a CRISPR/Cas9-mediated genome editing system in *lentinula edodes*. *Mycobiology* **49**: 599.
- Osten P., Dittgen T., Licznarski P. (2006): Lentivirus-based genetic manipulations in neurons *in vivo*. the dynamic synapse: molecular methods in ionotropic Receptor Biology 249–260.
- Parker A.L., Newman C., Briggs S., Seymour L., Sheridan P.J. (2003): Nonviral gene delivery: Techniques and implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* **5**: .
- Peng R., Lin G., Li J. (2016): Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS J* **283**: 1218–1231.
- Pollard V.W., Malim M.H. (1998): The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* **52**: 491–532.
- Potter H., Heller R. (2003): Transfection by Electroporation. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M. Ausubel  
[https://intra.pasteur.uypublico/bonilla/Protocolos/current\\_protocol\\_mol\\_biol.pdf](https://intra.pasteur.uypublico/bonilla/Protocolos/current_protocol_mol_biol.pdf)
- Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* **8**: 2281–2308.
- Richardson A., Heydari A.R., Morgan W.W., Nelson J.F., Sharp Z.D., Walter C.A. (1997): Use of transgenic mice in aging research. *ILAR J* **38**: 124–136.
- Ruben S., Perkins A., Purcell R., Joung K., Sia R., Burghoff R., Haseltine W.A., Rosen' C.A. (1989): Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* **63**: 1.
- Saupe S.J., Supattapone S. (2008): The paradox of model organisms. *EMBO Rep* **9**: 717–720.
- Tadić V., Josipović G., Zoldoš V., Vojta A. (2019): CRISPR/Cas9-based epigenome editing: An overview of dCas9-based tools with special emphasis on off-target activity. *Methods* **164–165**: 109–119.
- Turner B.G., Summers M.F. (1999): Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**: 1–32.
- White M., Whittaker R., Gándara C., Stoll E.A. (2017): A Guide to approaching regulatory considerations for lentiviral-mediated gene therapies. *Hum Gene Ther Methods* **28**: 163–176.
- CRISPR Cas9 Expression Construct | Cellecta, Inc - Cellecta. at <<https://cellecta.com/products/crispr-cas9-expression-construct?variant=17567346524250>> (pristupljeno 28.08.2023.).
- Canadian Biosafety Guideline: Lentiviral Vectors - Canada.ca. at <<https://www.canada.ca/en/public-health/services/canadian-biosafety-standards-guidelines/guidance/lentiviral-vectors/document.html>> (pristupljeno 13.09.2023.)

## 7. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Zadru 6. srpnja 2000. godine gdje sam završio osnovnu školu Petra Preradovića. Završio sam osnovnu glazbenu školu Blagoje Bersa u kojoj sam se usmjerio na sviranje gitare. Srednjoškolsko obrazovanje završio sam u gimnaziji Vladimira Nazora Zadar. Na državnom natjecanju iz biologije osvajam 2016. godine drugo mjesto u kategoriji eksperimentalnih radova zajedno s kolegicom Oliviom Ivankom Jurković pod mentorstvom prof. Marije Nižić. Upisujem preddiplomski sveučilišni studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu 2019. godine gdje sam odradio Laboratorijsku stručnu praksu u laboratoriju za genetiku i epigenetiku pod vodstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš. Osim hrvatskog, tečno govorim i engleski jezik.