

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Lovro Krhlanko

**Primjena rekombinantne DNA-tehnologije  
u genskoj terapiji**

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Lovro Krhlanko

**The use of recombinant DNA technology in  
gene therapy**

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa biologije na molekularnom zavodu biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

---

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

# Primjena rekombinante DNA-tehnologije u genskoj terapiji

Lovro Krhlanko

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Rekombinantna DNA tehnologija predstavlja niz metoda s kojima je moguće prenijeti gene iz jednog organizma u drugi. Prijenosom gena, protein koji se stvarao u početnom organizmu sada se stvara i u drugom. Jedna od primjena tehnologije rekombinantne DNA je u postupku genske terapije. Genska terapija je postupak u kojem se strana DNA, DNA koja sadrži gen od interesa, ubacuje u ljudske stanice s ciljem liječenja bolesti ili poremećaja. Za unos strane DNA postoje razne metode, a najuspješnija je korištenjem virusnih vektora. Genska terapija je revolucionarna metoda koja omogućuje liječenje genetskih bolesti.

Ključne riječi:

restriksijske endonukleaze, rekombinantna DNA, vektori, genetska bolest

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof.dr.sc Mirjana Pavlica

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

### The use of recombinant DNA technology in gene therapy

Lovro Krhlanko

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Recombinant DNA technology represents a number of methods by which it is possible to transfer genes from one organism to another. By gene transfer, the protein that was created in one organism is now created in the other one. One of the uses of recombinant DNA technology is the process of gene therapy. Gene therapy is a procedure in which foreign DNA, DNA containing the gene of interest, is inserted into human cells with the aim of treating a disease or disorder. Various methods are used to introduce foreign DNA, and the most successful is the use of viral vectors. Gene therapy is a revolutionary method that enables the treatment of genetic diseases.

**Keywords:**

restriction endonucleases, recombinant DNA, viral vectors, genetic disease  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof.dr.sc. Mirjana Pavlica

# Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. POVIJEST REKOMBINANTNE DNA TEHNOLOGIJE .....</b>	<b>2</b>
<b>3. METODE .....</b>	<b>3</b>
<b>4. GENSKA TERAPIJA.....</b>	<b>5</b>
4.1 Vektori u genskoj terapiji .....	7
4.1.1 RETROVIRUSI .....	8
4.1.2 ADENOVIRUSI .....	8
4.1.3 AAV (Adeno-asocirani virusi) .....	9
4.1.4 HERPES SIMPLEX VIRUSI .....	10
<b>5. USPJESI GENSKE TERAPIJE .....</b>	<b>11</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>12</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>15</b>

## 1. UVOD

Geni su osnovna jedinica nasljeđivanja, građena od deoksiribonukleinske kiseline (DNA). Genom čovjeka u sebi sadrži oko 20.500 gena koji kodiraju za proteine važne u biološkim procesima. Često se dogodi mutacija u genu koja uzrokuje bolest. Otkrićem rekombinantne DNA tehnologije stiglo je novo razdoblje manipuliranja i popravljanja gena. Tehnologija rekombinantne DNA omogućuje unos strane DNA ( gena ili segmenta gena) u genom drugog organizma. Ugradnjom stranog gena sintetizira se protein kojeg taj organizam prije nije imao. Razvojem rekombinantne DNA tehnologije stvoren je novi tip liječenja genetskih bolesti, a zove se genska terapija. Genska terapija je postupak unosa DNA (ljudska), sa funkcionalnim genom za neku bolest, u ljudske stanice s ciljem liječenja raznih bolesti i poremećaja. Cilj rada je približiti čitatelju postupak genske terapije koji je omogućen primjenom rekombinantne DNA tehnologije.

## 2. POVIJEST REKOMBINANTNE DNA TEHNOLOGIJE

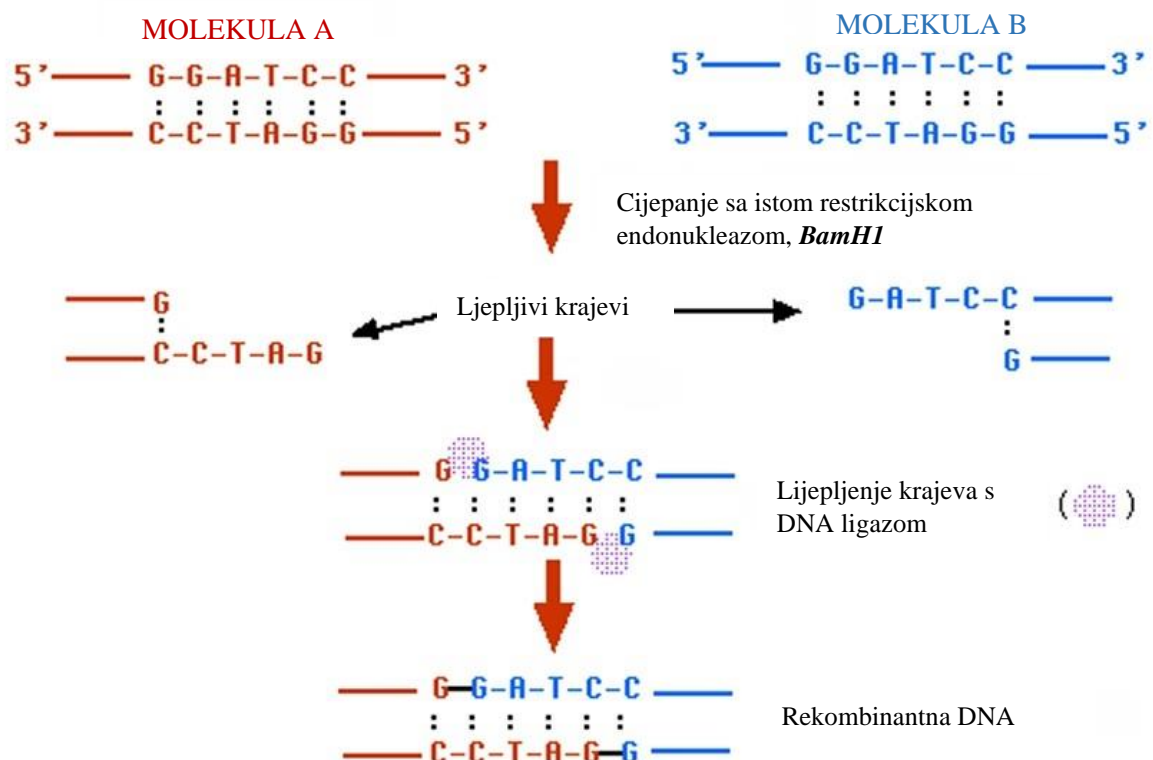
Razvoj genetičkog inženjerstva ili rekombinantne DNA tehnologije temelji se na znanstvenim otkrićima u genetici i molekularnoj biologiji baziranih na nasljeđivanju u živih organizama. Već se tijekom 1970-ih govorilo o spajanju dviju molekula DNA iz različitih organizama kako bi se dobila hibridna DNA i drugačija svojstva. Sve je krenulo otkrićem strukture DNA 1953. godine za koju su Francis Crick, James Watson i Maurice Wilkinson dobili Nobelovu nagradu 1962.g. (Godinić Mikulčić 2020).

Važna stavka povijesti genetičkog inženjerstva bilo je otkriće restrikcijskih endonukleaza. Restrikcijske endonukleaze su enzimi koji prepoznaju određenu nukleotidnu sekvencu te na tom mjestu cijepaju dvolančanu DNA. Ta sekvenca zove se restrikcijsko mjesto i čini ju 4-8 nukleotida. Restrikcijskih sekvenci ima puno i raspršene su po svim genomima. U bakterijama, restrikcijske endonukleaze čuvaju bakterijsku stanicu od napada bakteriofaga (bakterijskog virusa) tako da razgrade virusnu DNA. Restrikcijske endonukleaze dobivaju ime po bakteriji iz koje su izolirane. Restrikcijska endonukleaza *BamHI* izolirana je iz bakterije *Bacillus amyloliquefaciens* soja H1. (Pavlica 2022). Za otkriće restrikcijskih endonukleaza švicarski znanstvenik Werner Arber podijelio je 1978. godine Nobelovu nagradu s američkim znanstvenicima Danielom Nathansom i Hamiltonom Smithom. (Godinić Mikulčić 2020). Uz otkriće restrikcijskih endonukleaza, važno je i otkriće enzima DNA - ligaza. Ligaza je enzim koja spaja kohezivne (ljepljive) krajeve. Ljepljivi krajevi su jednolančani dijelovi DNA koji nastaju nakon cijepanja DNA s restrikcijskim endonukleazama. Nakon što se DNA pocijepa s istom restrikcijskom endonukleazom ljepljivi krajevi dijelova DNA se povezuje s vodikovim vezama između komplementarnih baza. Sva ta otkrića dovela su do mogućnosti stvaranja hibridne molekule čiji je genetički materijal podrijetlom iz različitih organizama. Godine 1972. stvorena je prva rekombinantna (hibridna) DNA molekula te se to smatra početkom genetičkog inženjerstva (doba rekombinantne DNA tehnologije). Stvaranje rekombinantne DNA molekule prikazano je na slici 1. Za to otkriće je 1980. godine biokemičar Paul Berg, zajedno s Walterom Gilbertom i Frederickom Sangerom dobio Nobelovu nagradu za kemiju. (Godinić Mikulčić 2020).

Otkrićem rekombinantne DNA stvorila se mogućnost liječenja raznih bolesti, poremećaja, stvaranja važnih proteina kao npr. proizvodnja ljudskog inzulina u bakteriji *Escherichia coli*,



produkcija cjepiva, unos funkcionalnih gena genskom terapijom itd. (Pavlica 2022).  
 Rekombinantna DNA tehnologija predstavlja niz metoda uz pomoć kojih se prenose geni iz  
 jednog organizma u drugi.

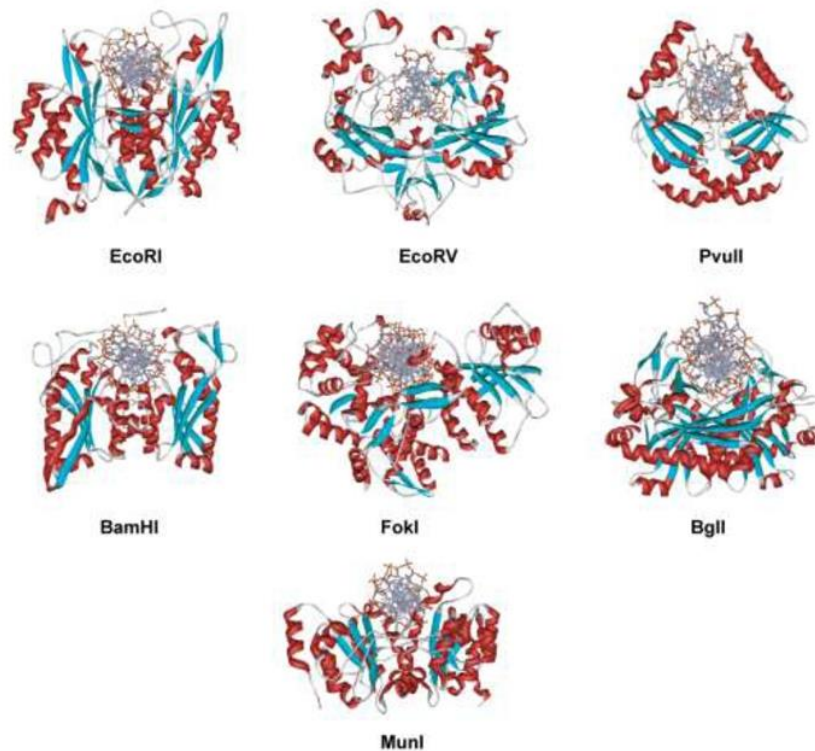


Slika 1. Konstruiranje rekombinantne DNA (Avinash i sur. 2014).

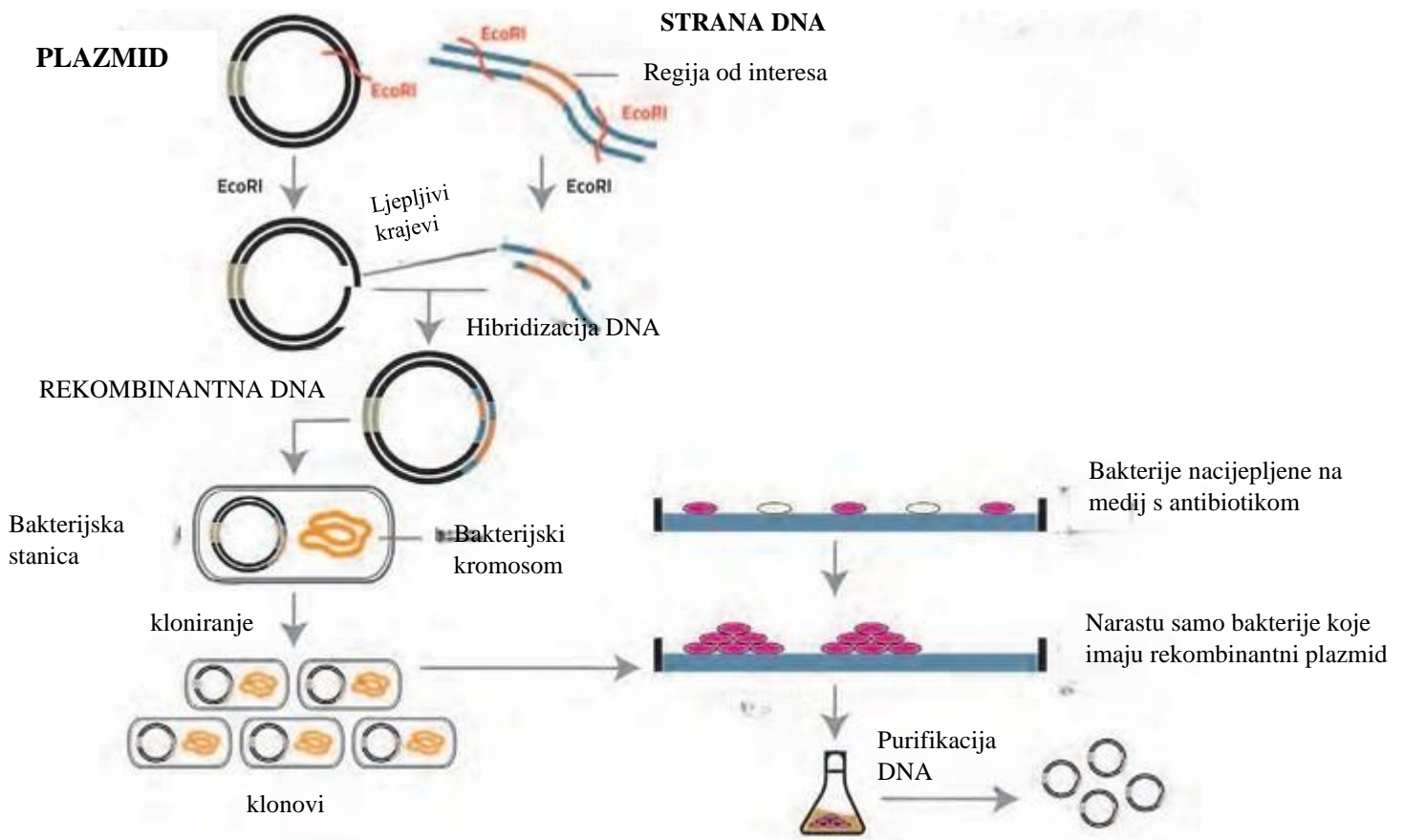
### 3. METODE

Metode u rekombinantnoj DNA tehnologiji služe za ugradnju stranog gena u genom stanice domaćina (eukariotska ili prokariotska stanica). Molekularno kloniranje je postupak

kojem se segment strane DNA ugrađuje u DNA vektora koji je sposoban samoreplicirati se u stanicama domaćina. Vektori su molekule DNA u koje se može ugraditi određeni gen ili segment gena te ih potom prenijeti u stanicu domaćina. Prvi korak je izolacija DNA iz vektora i organizma koji ima željeni gen. Slijedi cijepanje restriksijskim endonukleazama (RE). Slika 2 prikazuje kristalne strukture nekih restriksijskih endonukleaza. Važno svojstvo restriksijskih endonukleaza je sposobnost cijepanja DNA na točno određenim mjestima, u većini slučajeva to su palindromski slijedovi baza (redosljed je isti s obje strane) (Pavlica 2022). Kada se strana DNA i vektorska DNA pocijepaju s istom restriksijskim endonukleazom, dolazi do spajanja tih dviju molekula DNA, enzimom ligazom, u jednu rekombinantnu molekulu te taj kompleks sada nazivamo rekombinantni vektor. Cijeli postupak prikazan je na slici 3. Sposobnost manipulacije genoma virusa dovelo je do razvoja genetički modificiranih virusa koji su postali glavna karika u razvoju genske terapije.



Slika 2. Prikaz kristalnih struktura nekih restriksijskih endonukleaza (Pingoud i sur. 2014).



Slika 3. Prikaz postupka molekularnog kloniranja. U bakterijski plazmid (u ovom slučaju vektor) se ubaci strana DNA te se takav rekombinantni plazmid ubacuje u bakterijsku stanicu. Bakterijska stanica se dijeli, a prije toga se umnožava rekombinantni plazmid što nazivamo kloniranje. Bakterijski klonovi se nacijepu na selektivni medij na kojem mogu rasti samo rekombinantne bakterije (one koje imaju rekombinantni plazmid) (Librowski i sur. 2013).

#### 4. GENSKA TERAPIJA

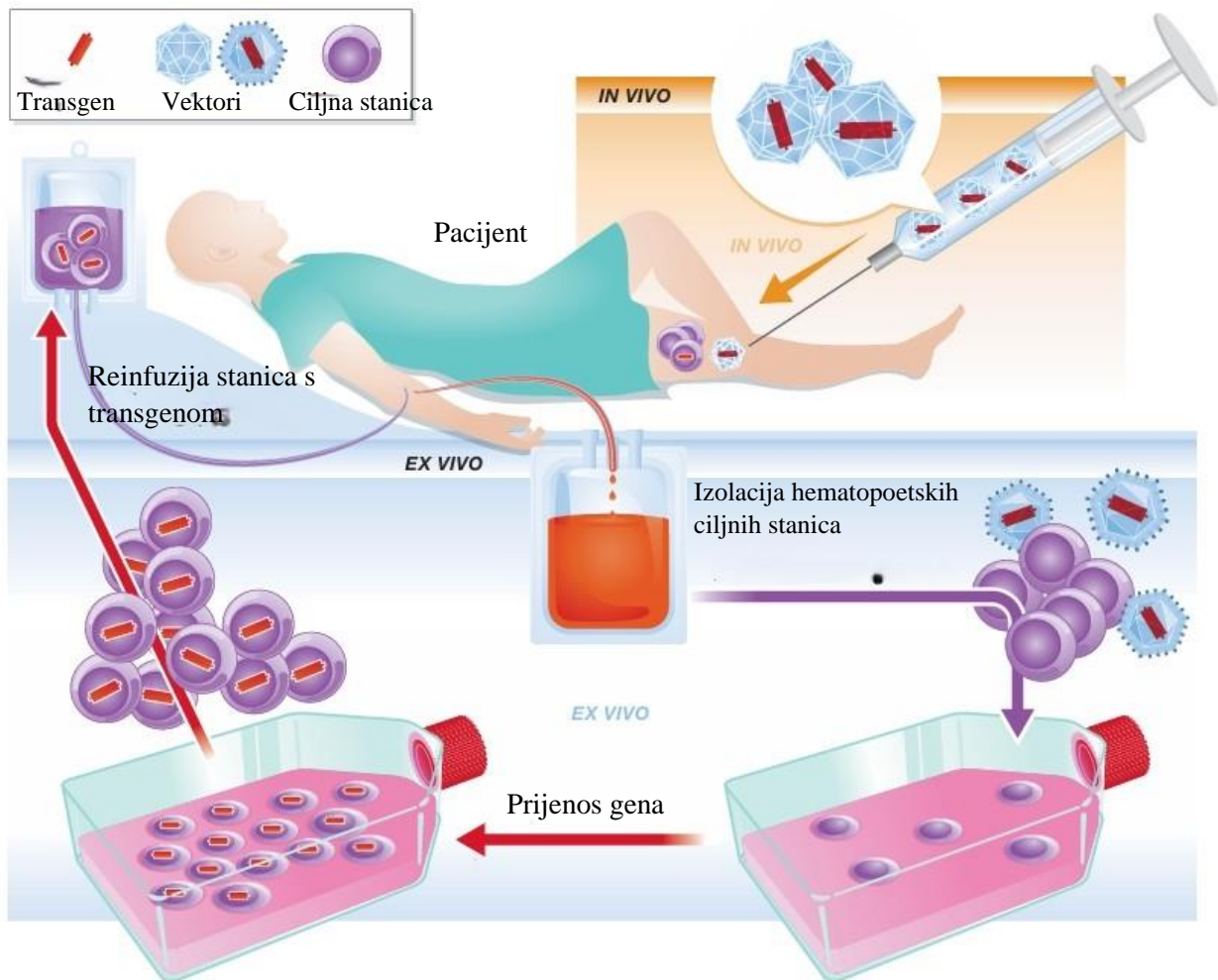
Genska terapija je postupak u kojem se strana DNA (gen ili segment gena) ubacuje u ljudske stanice s ciljem liječenja ili prevencije raznih poremećaja. Europska agencija za lijekove (*European Medicines Agency*) definira gensku terapiju kao biološki medicinski lijek koji mora pratiti sljedeće dvije stavke (Parker i sur. 2013):

1. Lijek mora sadržavati aktivnu tvar koja se sastoji od rekombinantne DNA koja bi kod ljudi regulirala, popravljala, zamjenjivala, dodavala i utišavala genetsku sekvencu.

2. Njezin ljekoviti ili dijagnostički učinak mora biti učinak rekombinantne DNA koja se u njoj nalazi.

Na temelju vrsta stanica na kojima se događa modifikacija gena, gensku terapiju možemo podijeliti na gensku terapiju spolnih stanica i somatsku gensku terapiju. Somatskom genskom terapijom modifikacija gena se ne prenosi na sljedeće generacije, dok kod genske terapije spolnih stanica dolazi do nasljeđivanja genskih modifikacija. (Parker i sur. 2013). Genska terapija spolnih stanica naziva se još i nasljedna genska terapija (eng. *heritable gene therapy*). U većini zemalja pokusi koji se rade na temelju genske terapije spolnih stanica su zabranjeni. Trenutačno se u kliničkim ispitivanjima najviše koristi somatska genska terapija. (Glavan 2023).

Još jedna podjela genske terapije temelji se na tome dostavlja li se vektor *in vivo* ili *ex vivo*. *Ex vivo* (izvan tijela) podrazumijeva izdvajanje stanice iz određenog tkiva pacijenta te njena modifikacija i introdukcija u pacijenta transplantacijom ili infuzijom. Ovaj postupak najčešće se izvodi na hematopoetskim matičnim stanicama. *In vivo* (u tijelu) podrazumijeva unos genskog lijeka direktno u tijelo pacijenta gdje će se on proširiti i genetički modificirati određene stanice. (Buning i sur. 2013). Postupak je prikazan na slici 4.



Slika 4. Prikaz *in vivo* i *ex vivo* genske terapije (Buning i sur. 2013).

#### 4.1 Vektori u genskoj terapiji

Jedan od izazova u razvoju genske terapije bio je unos genetičkog materijala u stanice. Genetički materijal može se uvesti pomoću virusnog vektora ili nevirusnim pristupom. Od razvijenih nevirusnih pristupa prijenosa genetičkog materijala, dvije metode su najviše korištene u kliničkim ispitivanjima. (Cotrim i Baum 2008). Prva metoda se temelji na direktnom injektiranju plazmida, koji sadrži transgen (gen koji se želi ubaciti u stanicu), u tkivo pacijenta, najčešće u mišić. Druga metoda bazira se na upotrebi liposoma (vezikula koja je omeđena membranom) koji obavijaju plazmidnu DNA (koja sadrži transgen) i endocitozom ulaze u stanicu. (Cotrim i Baum 2008). Prijenos virusnim vektorima je najčešća metoda prijenosa genetičkog materijala i koristi se u većini kliničkih ispitivanja. Virusi su visoko evoluirani biološki strojevi koji imaju sposobnost inficiranja stanica domaćina i korištenja njegove

stanične mašinerije za svoju replikaciju. Važno je virusu koji je vektor maknuti neke kodirajuće regije njegova genoma, ali ostaviti one regije koje kodiraju za pakiranje željene DNA u kapsidu virusa. (Ehrhardt i sur. 2003).

Virusni vektori su vrlo efikasni u prijenosu gena u stanicu. U teoriji, idealni vektor trebao bi biti izrazito specifičan, imati sposobnost prenošenja više gena, trebao bi ostati nezapažen od imunskog sustava, ne bi smio uzrokovati alergijske reakcije i trebao bi ekspimirati modificirani gen tijekom cijelog života. (Misra 2013). Neki od tih virusnih vektora su retrovirusi, adenovirusi, adeno – asociirani virusi (*adeno-associated viruses*, AAV), poxvirusi i herpes-simplex (HSV) virusi.

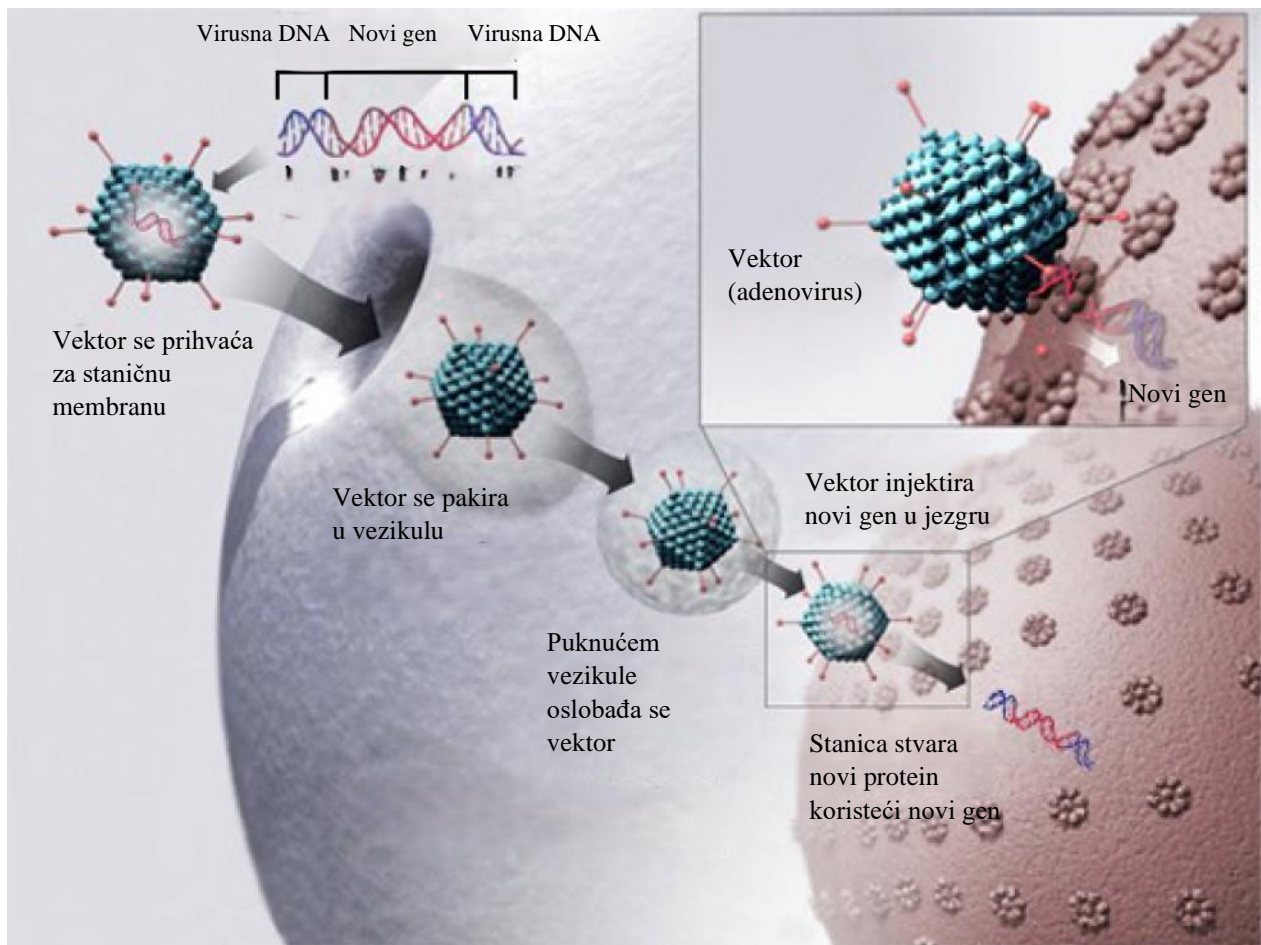
#### **4.1.1 RETROVIRUSI**

Retrovirusi su prvi virusni vektori korišteni u kliničkim ispitivanjima u genskoj terapiji. To su RNA virusi koji imaju enzim reverznu transkriptazu (enzim koji prepisuje RNA u DNA). Zbog enzima integraze imaju sposobnost integriranja u genom domaćina, što dovodi do problema. Taj enzim proizvoljno integrira genetski materijal virusa u genom domaćina što može dovesti do insercijske mutageneze (ako se insercija dogodi u sredini gena) ili nekontroliranog dijeljenja stanice što onda dovodi do raka. (Misra 2013).

#### **4.1.2 ADENOVIRUSI**

Adenovirusi su neintegrirajući DNA virusi. Genom adenovirusa je uvelike modificiran delecijom virusnih gena kako bi se dobio siguran i učinkovit vektor. (Burtscher i sur. 2021). Prednosti adenovirusa su mogućnost unosa transgena u čitav niz tkiva i stanica. Slika 5 prikazuje unos transgena pomoću vektora na bazi adenovirusa. Međutim, adenovirusi imaju veću šansu biti napadnuti od strane imunskog sustava te postoji mogućnost da izazovu razne upale u tkivima. (Misra 2013). Unatoč ovim problemima p53, vektor baziran na adenovirusima, je prvi licencirani lijek genske terapije koji se koristio za liječenje karcinoma glave i vrata. (Misra 2013).





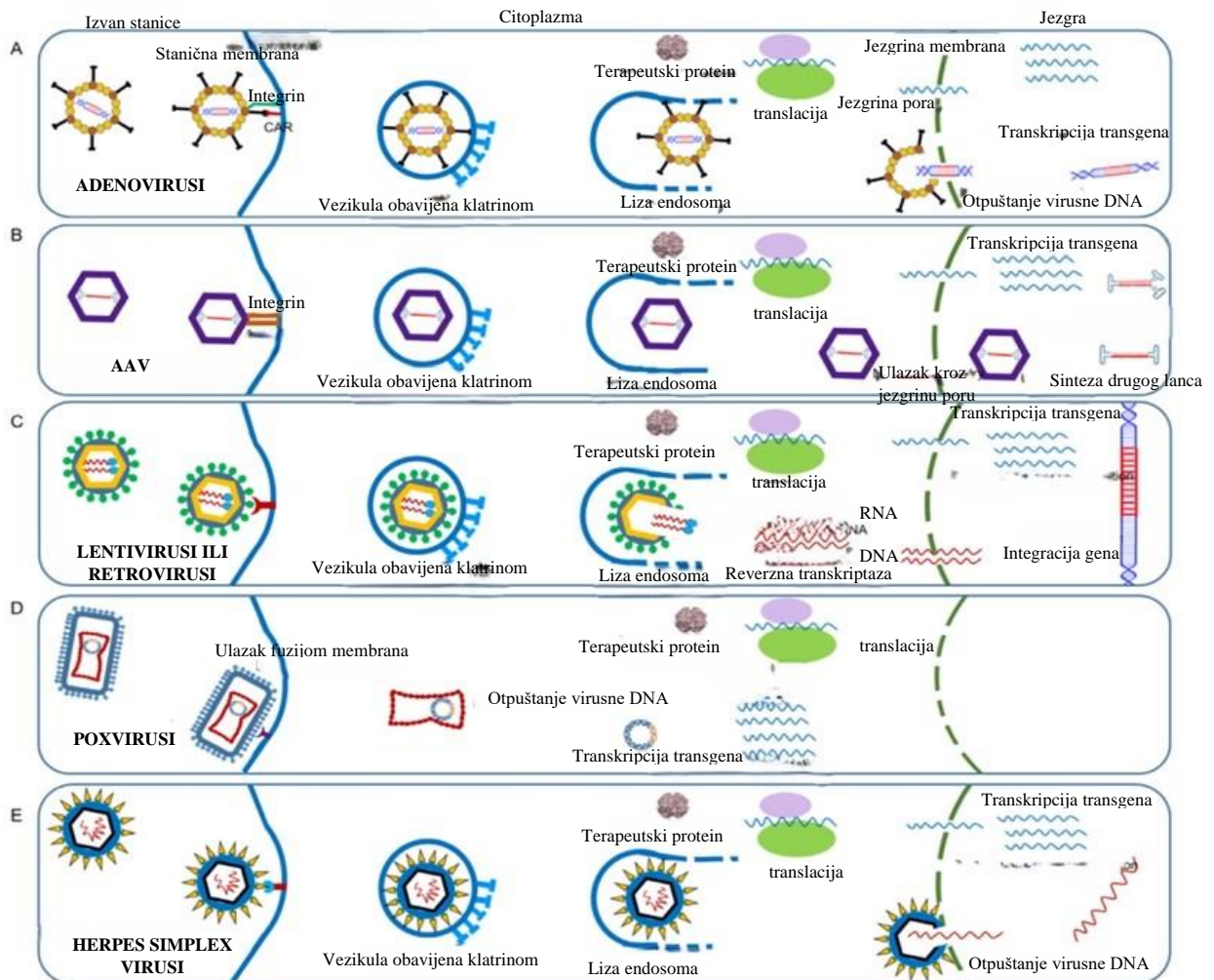
Slika 5. Prikaz genske terapije pomoću adenovirus vektora Izvor: <https://openstax.org/books/concepts-biology/pages/10-2-biotechnology-in-medicine-and-agriculture>

#### 4.1.3 AAV (Adeno-asocirani virusi)

Adeno-asocirani virusi su DNA virusi iz porodice *Parvovirus*. Imaju mogućnost insercije genetičkog materijala u specifično mjesto na kromosomu 19 sa skoro 100% sigurnošću. (Misra 2013). Smatra se da većina ljudi u svom tijelu imaju adeno-asocirane viruse te oni ne uzrokuju odgovor imunskog sustava niti upale. Loša strana kod AAV-a, je ta što su mali i mogu nositi samo 2 gena u svom prirodnom stanju. Problem je i taj da mogu proizvesti štetu u genomu domaćina jer se njihovi geni direktno integriraju u genom. Trenutačno, AAV vektori se koriste za inserciju gena u mozak jer mogu inficirati neurone. (Misra 2013).

#### 4.1.4 HERPES SIMPLEX VIRUSI

Herpes simplex virusi su neurotropni virusi koji se najčešće koriste kao vektori za prijenos u živčani sustav. Također mogu inficirati veliki broj tkiva kao npr. mišiće, jetru, gušteraču itd. Herpes simplex virusi imaju veliki genom što omogućava inserciju više transgena. Zbog toga se misli da će vektori bazirani na herpes simplex virusima moći liječiti poremećaje nastale zbog više nefunkcionalnih gena. (Misra 2013).



Slika 6. Prikaz načina transporta transgena u stanice domaćina pomoću raznih virusa koji služe kao vektori (Burtscher i sur. 2021).



## 5. USPJESI GENSKE TERAPIJE

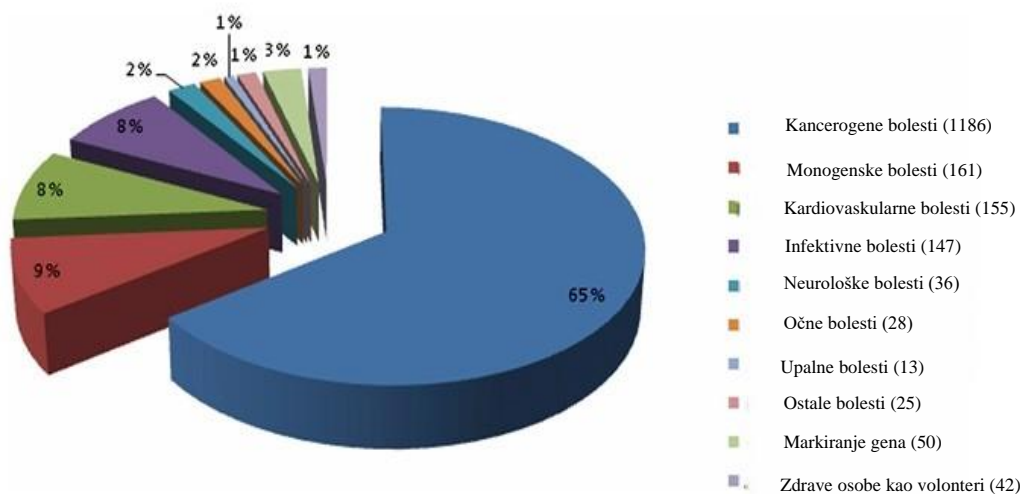
Genska terapija odobrena je na ljudima 1990. godine od strane Američkog instituta za zdravlje (FDA). Prvi pacijent bila je četverogodišnja djevojka koja je imala mutaciju gena za enzim adenzin amilazu što uzrokuje nasljedni imunološki poremećaj SCID. Znanstvenici su uzeli bijele krvne stanice iz krvi pacijentice, modificirali ih *ex vivo* kako bi se gen za adenzin amilazu normalno ekspimirao. (Parker i sur. 2013).

Godine 2003. Kina je postala prva zemlja koja je dopustila korištenje produkta nastalog genskom terapijom imena Genidicine. To je lijek za liječenje karcinoma glave i vrata putem intratumorske injekcije. Radi se o rekombinantnom adenovirusnom vektoru koji u sebi nosi gen p53, kojega nema u tumorskim stanicama, a bitan je u održavanju stabilnosti stanice. (Parker i sur. 2013).

2012. godine odobrena je prva genska terapija u Europskoj uniji. Lijek Glybera je rekombinantni AAV vektor koji liječi pacijente s nedostatkom lipoproteinske lipaze, ali je 2017.g. povučen s tržišta. (Šarčević 2021).

Lijek naziva Luxturna koristi se kod liječenja odraslih osoba i djece koji imaju nasljednu retinalnu distrofiju koja uzrokuje gubitak vida. Kod nje je mutiran gen *RPE65*. *In vivo* terapijom pomoću AAV vektora unosi se ispravna kopija gena. Lijek se dostavlja injekcijom u stražnji dio oba oka, te ga virus prenosi u stanice mrežnice, koje onda proizvode enzim koji im je potreban. (Šarčević 2021).

Lijek Exondys 51 (eteplirsen) je prvi lijek na osnovi genske terapije koji se koristi u borbi protiv Duchenneove mišićne distrofije (DMD). Odobren je od strane FDA 2016.godine. Ljudi koji boluju od Duchenneove mišićne distrofije ne proizvode protein distrofin. Exondys 51 omogućuje preskakanje egzona 51 u genu čime omogućava proizvodnju skraćenog tipa distrofina, koji umanjuje simptome bolesti. (Šarčević 2021).



Slika 7. Grafikon prikazuje bolesti koje su trenutačno najviše zastupljene u kliničkim ispitivanjima za gensku terapiju (Parker i sur. 2013).

## 6. ZAKLJUČAK

Rekombinantna DNA tehnologija predstavlja jedan od najvećih uspjeha u molekularnoj biologiji. Rekombinantna DNA tehnologija omogućila je stvaranje novih kombinacija genetičkog materijala i ugradnju tog genetičkog materijala u vektore, posebno virusne vektore koji su omogućili unos gena u ljudske stanice s ciljem liječenja raznih poremećaja. Do otkrića genske terapije, genetske bolesti imale su vrlo visoki mortalitet i nije bilo puno opcija za liječenje istih. Genska terapija omogućila je borbu protiv genetskih bolesti. Međutim, genska terapija se još uvijek suočava s nekim problemima, kao što su rizici terapije, etičko pitanje. Daljnja istraživanja bit će potrebna kako bi se unaprijedio prijenos gena, smanjili rizici od nuspojava i omogućila učinkovitost terapije tijekom cijelog života pacijenta. Sve u svemu, genska terapija predstavlja budućnost liječenja genetskih bolesti te budućnost personaliziranog liječenja na temelju genoma pacijenta.

## 7. LITERATURA

Avinash M., Jasbeer S., Pramod S. K., Rishabh M. (2014) An introduction to DNA-recombinant technology and their application in human therapeutics. *Journal of drug delivery and therapeutics*, 4(4) : 104-109

Baum B. J., Cotrim A.P. (2008) Gene therapy: Some history, Applications, Problems, and Prospects. *Toxicologic pathology*, 36:97-103.

Buning H., Galy A., Grez M., Kaufmann K. B., Schambach A. (2013) Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med* 5:1642-1661

Burtscher I., Lickert H., Nazari Z., Shahryari A. (2021) Engineering Gene therapy: Advances and Barriers. *Advanced therapeutics*, 4

Ehrhardt A., Kay M. A., Thomas C. E. (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 4: 346-358

Glavan T. (2023) Genska terapija – temeljni principi, klinička primjena i budućnost. *Diplomski rad, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Rijeka*

Godinić Mikulčić V. (2020) Povijesni i tehnološki razvoj genetičkog inženjerstva u Hrvatskoj. *Studia lexicographica* 14, str. 91-130

Librowski T., Lochynski S., Kiepusa K., Stryjewska A. (2013); Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part 1. DNA technology and recombinant proteins. Pharmacological Reports , 65, 1075-1085

Mirjana Pavlica, 2022, mrežni udžbenik iz genetike, 20. poglavlje  
<https://www.genetika.biol.pmf.hr/docs/sadrzaj/20-poglavlje/>

Misra S. (2013) Human gene therapy: A Brief Overview of the Genetic Revolution. The Journal of the Association of Physicians of India, 61(2): 127-33

Parker N., Wirth T., Yla-Herttuala S. (2013) History of gene therapy. Gene, 525:162-169

Pingoud A., Wende W., Wilson G. G. (2014) Type II restriction endonucleases – a historical perspective and more. Nucleic Acids research, 42: 7489-7527.

Šarčević A. (2021) Genska terapija i njena primjena u kliničkoj medicini. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb

<https://openstax.org/books/concepts-biology/pages/10-2-biotechnology-in-medicine-and-agriculture>

## 8. ŽIVOTOPIS

Moje ime je Lovro Krhlanko. Rođen sam 7.12.2002. u Zagrebu. Završio sam Gimnaziju Lucijana Vranjanina, prirodoslovno-matematički smjer. Trenutačno završavam 3.godinu preddiplomskog studija biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Sljedeće akademske godine planiram upisati diplomski studij molekularne biologije isto na PMF-u u Zagrebu.