Liječenje virusnih infekcija HIV-a metodom CRISPR-CAS9

Bujanić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:902920

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

LIJEČENJE VIRUSNIH INFEKCIJA HIV-A METODOM CRISPR-CAS9

TREATMENT OF HIV INFECTIONS USING CRISPR-CAS9

SEMINARSKI RAD

Lucija Bujanić
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Programme in Molecular Biology)
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2018.

Sadržaj

1. Uvod 2
1.1. Virus humane imunodeficijencije (HIV) 2
1.2. Tehnike uređivanja genoma 2
1.3. CRISPR-Cas9 4
2. CRISPR-Cas9 sustav kao obrana protiv virusa HIV-a 7
2.1. Inaktivacija provirusne DNA 7
2.2. Intracelularna obrana protiv infekcije 9
2.3. Izbjegavanje inhibicije 9
2.4. Sprječavanje izbjegavanja inhibicije sustavom CRISPR-Cas9 11
3. Ograničenja metode 14
4. Zaključak 16
5. Sažetak 17
6. Summary 18
7. Literatura 19

1. Uvod

1.1. Virus humane imunodeficijencije (HIV)

Virus humane imunodeficijencije (HIV) je retrovirus čija se genomska RNA prepisuje u dvolančanu DNA reverznom transkriptazom. Dobivena molekula DNA zatim se ugrađuje u genom domaćina i nastaje provirus iz kojeg se mogu prepisivati nove virusne RNA molekule. HIV je patogen koji uzrokuje sindrom stečene imunodeficijencije (AIDS), bolesti koja zahvaća cijeli svijet, a za koju ne postoji efikasno i komercijalno dostupno cjepivo. Iako pravog lijeka nema, postoje brojne antiretrovirusne terapije (ART) koje smanjuju virusno opterećenje organizma i sprječavaju daljnji napredak bolesti (Wang *et al*., 2017). No, ti lijekovi ne utječu na latentne viruse, odnosno provirusnu DNA u neaktivnim T-limfocitima i drugim stanicama sa duljim životnim vijekom (Blankson *et al*, 2002). Zbog toga, ukoliko se prekine terapija, može doći do ponovne aktivne infekcije pa su osobe zaražene HIV-om prisiljene na doživotno korištenje ART terapije. Kontinuirano korištenje lijekova može imati negativan utjecaj na život pojedinca zbog financijskog opterećenja i mogućih nuspojava koje štete organizmu.

HIV ima sposobnost stjecanja otpornosti na lijekove, što je najviše izraženo ukoliko replikacija nije potpuno suprimirana. Reverzna transkriptaza je sklona pogreškama prilikom reverzne transkripcije pa često nastaju mutirane virusne DNA molekule koje mogu biti otporne na određeni lijek. Osim toga, ART terapije ne suprimiraju ekspresiju gena provirusne DNA što znači da iako nema širenja infekcije, ipak dolazi do stvaranja virusnih proteina koji mogu uzrokovati upale. Da bi se potpuno izliječila virusna infekcija HIV-a potrebno je spriječiti reaktivaciju virusa, ekspresiju proteina i stvaranje otpornosti, odnosno ukloniti svu provirusnu DNA iz inficiranih stanica. Kako bi se to postiglo potrebne su nove metode uređivanja DNA molekula (Wang *et al*, 2017).

1.2. Tehnike uređivanja genoma

Na stanicama domaćina postoje dva kemokina koreceptora za ulazak virusa HIV-a, CCR5 i CXCR4. Za uspješan ulazak virusa u stanice potrebno je vezanje proteina ovojnice za

glavni receptor CD4 i za jedan od navedenih koreceptora (Soppe *et al*., 2017). U primarnu infekciju najčešće je uključen virus koji koristi CCR5 koreceptor. U kasnijim fazama infekcije moguće su mutacije u proteinu ovojnice koje mogu uzrokovati promjenu koreceptora, odnosno korištenje CXCR4 (Wang *et al*., 2017).

Spontana delecija 32 nukleotida u genu koji kodira za CCR5 sprječava ekspresiju tog koreceptora na staničnoj površini. Osobe koje su homozigoti za taj genotip (CCR5Δ32) su rezistentni na infekciju HIV-om, a delecija nema drugih posljedica na fenotipu (Dean *et al*., 1996). Zabilježen je jedan slučaj u kojem je kod pacijenta zaraženog HIV-om suprimirana replikacija virusa tako što je pacijent podvrgnut transplantaciji matičnih stanica na način da su matične stanice tog pacijenta u potpunosti zamijenjene sa stanicama donora koji je homozigot za navedenu mutaciju (Hutter *et al*., 2009). Prema tome, zaustavljanje ekspresije CCR5 koreceptora sprječava virusnu infekciju, no problem je u tome da postoji malen broj potencijalnih donora koji su homozigoti za CCR5Δ32 genotip. Zbog toga je vrlo bitan razvoj tehnika uređivanja DNA koje bi se mogle koristiti za djelomično *(*eng. *knockdown)* ili potpuno utišavanje *(*eng. *knockout)* ekspresije CCR5 (Cornu *et al*., 2015). No, inaktivacija CCR5 ne štiti domaćina od mutiranih varijanti virusa koje koriste CXCR4 koreceptor pa je potrebno suprimirati i ekspresiju koreceptora CXCR4 i ostalih faktora koji su uključeni u replikaciju virusa. Problem je u tome što bi potpuna supresija, ili čak samo smanjenje ekspresije tih faktora, moglo imati negativan utjecaj na fenotip (Park *et al*., 2017).

Napretkom metoda uređivanja DNA otvorene su nove mogućnosti liječenja virusnih infekcija HIV-a koristeći različite tehnike rekombinazama i nukleazama. Najranije metode uključivale su dizajnirane rekombinaze temeljene na Cre-rekombinazi čija je meta bila duga terminalna regija koja se nalazi na oba kraja provirusne DNA (LTR – eng. *long terminal repeat*) (Karpinski *et al*., 2016). Korištene su i tehnike temeljene na endonukleazama koje prepoznaju specifične sekvence DNA. One se mogu koristiti i za cijepanje staničnih gena koji sudjeluju u replikaciji ili ulasku virusne RNA, npr. stanični receptor CCR5. To su nukleaze cinkovih prstiju (ZFN – eng. *zinc finger nuclesases*), TALEN – eng. *transcription activator-like effector nucleases* i nedavno otkriven eng. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) i CRISPR-*associated* (Cas) sustav (CRISPR-Cas) (Wang *et al*., 2017).

1.3. CRISPR-Cas9

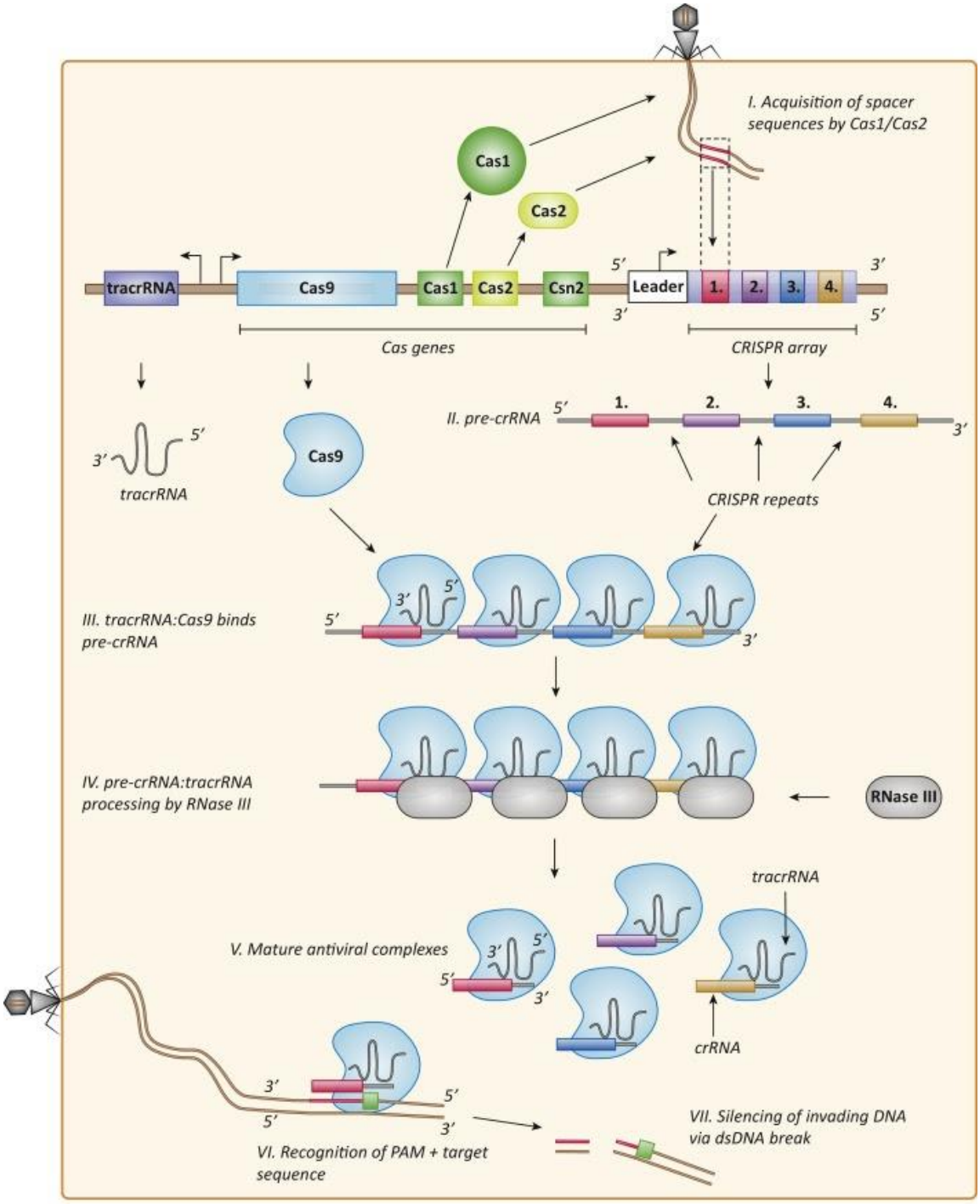
Sustav CRISPR-Cas je obrambeni mehanizam prokariota protiv invadirajućih molekula nukleinskih kiselina. CRISPR-Cas omogućava bakterijama i arhejama sustav stečene imunosti na bakteriofage i plazmide (Soppe *et al*., 2017). Sastoji se od lokusa CRISPR koji sadrži regije ponavljajuće DNA (palindromi duljine 21-48 pb) isprekidane varijabilnim razmaknicama (eng. *spacers*). Razmaknice su zapravo sljedovi nukleotida koji odgovaraju sekvenci DNA invadirajuće molekule s kojom se bakterija ranije susrela, odnosno koja je bakteriju već invadirala. Prije nego što se razmaknica ugradi u lokus CRISPR, ona se naziva proto-razmaknica (Mojica *et al*., 2005), a ugrađuje se uz pomoć proteina Cas. Ugrađena razmaknica predstavlja sustav imune memorije i ukoliko dođe do ponovne infekcije, razmaknice se, uz pomoć proteina Cas, koriste za eliminaciju invadirajuće DNA (Yosef *et al*, 2012).

Postoje tri faze u obrambenom odgovoru sustava CRISPR-Cas, to su (1.) adaptacija i integracija razmaknice, (2.) prepisivanje lokusa CRISPR i sazrijevanje crRNA (CRISPR RNA) te (3.) interferencija i utišavanje stranog genetičkog elementa (Maraffini, 2015). U različitim vrstama bakterija postoje različiti tipovi sustava CRISPR-Cas, točnije 6 tipova podijeljenih u dvije klase, a razlikuju se po proteinima Cas. Najpoznatiji sustav je tip II iz bakterije *Streptococcus pyogenes,* koji se koristi u uređivanju genoma. Proteini Cas su endonukleaze i većina sustava CRISPR koristi nekoliko proteina Cas za izrezivanje invadirajuće dlDNA (Slika 1). S druge strane, tip II sustava CRISPR-Cas koristi jednu endonukleazu – Cas9 pa se sustav još naziva i CRISPR-Cas9 te je zbog njegove jednostavnosti i započela njegova primjena u genetičkom inženjerstvu (Mohanraju *et al*., 2016).

U sustavu CRISPR-Cas9 proteini Cas1 i Cas2 sudjeluju u prepoznavanju, procesiranju i integraciji invadirajućih genetičkih elemenata u razmaknice koje se nalaze u lokusu CRISPR. Tijekom transkripcije lokusa CRISPR nastaje dugačka molekula pre-crRNA koja sadrži razmaknice i ponavljajuće sekvence CRISPR (Barrangou, 2015). Trans-aktivirajuća CRISPR RNA (tracrRNA) koja se eksprimira s lokusa CRISPR veže se na ponavljajuće sekvence pre-crRNA komplementarnim sparivanjem pri čemu nastaje dvolančana RNA. Kompleks crRNA:tracrRNA stabiliziran je proteinom Cas9 i dolazi do procesiranja RNazom III koja cijepa pre-crRNA na mjestu ponavljajućih sljedova. Time nastaje velik broj antivirusnih kompleksa

koji se sastoje od male molekule zrele crRNA (ona sadrži razmaknicu i CRISPR ponavljajući slijed), tracrRNA koja je vezana na ponavljajući slijed crRNA i endonukleaze Cas9. Kompleks crRNA:tracrRNA navodi endonukleazu prema stranoj DNA molekuli koja sadrži odgovarajuću proto-razmaknicu (Amitai, Sorek, 2016). Proto-razmaknica se od razmaknice razlikuje u postojanju sekvence PAM (eng. *protospacer adjacent motif*), koja kod *S. pyogenes* glasi 5'-NGG-3', a nalazi se nizvodno od 3'-kraja proto-razmaknice. Prilikom ugradnje razmaknice, izrezuje se sekvenca PAM pa se na taj način razlikuje invadirajuća DNA od endogenog lokusa CRISPR i spriječeno je djelovanje sustava CRISPR-Cas na vlastiti genom. Nakon što Cas9 prepozna sekvencu PAM, dolazi do komplementarnog sparivanja crRNA i sekvence invadirajuće DNA (da bi došlo do sparivanja, komplementarnost mora biti potpuna ili gotovo potpuna). Nakon sparivanja, nukleaza Cas9 inducira dvolančani lom invadirajuće DNA 3 nukleotida uzvodno od regije PAM. Induciranjem dvolančanih lomova spriječi se nastajanje virusne infekcije (Soppe *et al*., 2017).

Za korištenje sustava CRISPR-Cas9 u uređivanju genoma napravljene su određene promjene. Razmaknica u crRNA zamijeni se specifičnom sekvencom koja navodi protein Cas9 do željene molekule dlDNA, pod uvjetom da dlDNA sadrži slijed komplementaran razmaknici i sekvencu PAM (proto-razmaknicu). Osim toga, geni za tracrRNA i crRNA fuzioniraju se i transkripcijom nastaje molekula gRNA (eng. *guide RNA*) koja ulazi u kompleks s proteinom Cas9 i navodi ga do proto-razmaknice (Jinek *et al*., 2013).



Slika 1. Shematski prikaz djelovanja sustava CRISPR-Cas9 u bakteriji *Streptococcus pyogenes*. (Preuzeto iz: Soppe *et al*., 2017)

2. Sustav CRISPR-Cas9 kao obrana protiv virusa HIV-a

Korištenje sustava CRISPR-Cas9 za liječenje virusnih infekcija HIV-a svodi se ili na liječenje već inficiranih stanica, ili na sprječavanje infekcije u neinficiranim stanicama. Kod već inficiranih stanica nukleaza Cas9 i gRNA koja sadrži sekvencu komplementarnu virusnoj, uvode se u stanice kako bi napale provirusnu DNA. S druge strane, kod neinficiranih stanica, nukleaza Cas9 i gRNA molekule se uvedu u stanice i očekuju potencijalan napad virusa (Wang *et al*., 2017).

2.1. Inaktivacija provirusne DNA

Jedan od najvećih problema kod liječenja virusnih infekcija HIV-a su stanice s latentnom infekcijom. Zbog toga se istražuje potencijal sustava CRISPR-Cas9 u traženju i degradaciji provirusne DNA u zaraženim stanicama, a u istraživanjima se koriste različiti tipovi staničnih kultura.

Česta meta u istraživanjima je domena LTR u virusnoj DNA jer se ona nalazi na oba kraja provirusnog genoma (5' i 3' krajevi) pa jedna molekula gRNA napada provirus na 2 mjesta. Pritom dolazi i do ligacije slobodnih krajeva kromosomske DNA domaćina, odnosno delecije cijele virusne DNA iz kromosoma. U istraživanju Ebina *et al*., 2013, kao model za integrirani provirusni genom HIV-a korištene su stanice s integriranim lentivirusnim vektorima. Pokazano je da se količina reporter gena vezanog na domenu LTR smanjuje ako se stanice tretiraju s CRISPR-Cas9 čija gRNA djeluje na sekvencu LTR. Sekvencioniranjem je zatim potvrđeno da je došlo do stvaranja insercija i delecija u regiji LTR, ali i delecije svih vektorskih sekvenci koje se nalaze između dvije LTR regije (no u manjoj mjeri). U istraživanju Hu *et al*., 2014, je pokazano da korištenjem dviju molekula gRNA za djelovanje na sekvencu LTR, dolazi ili do delecije fragmenta između dvije regije LTR, ili delecije svih lentivirusnih sekvenci koje se nalaze između 5' i 3' krajeva. Slično tome, pokazano je da kod stanica s kroničnom infekcijom dolazi do izrezivanja fragmenta LTR ili uklanjanja gotovo cjelokupne provirusne DNA iz staničnog genoma ako se koriste dvije molekule gRNA za prepoznavanje regije LTR. Osim toga, kod stanica s provirusnim genomom je tretman s CRISPR-Cas9 uzrokovao mutacije ili eksciziju

virusnih sekvenci. Dakle, tretman stanica s dvije molekule gRNA pokazao se efikasniji u usporedbi s korištenjem jedne molekule (Liao *et al*., 2015).

Kod stanične linije humanih T-limfocita (*Jurkat cells*) koje sadrže integrirani latentni provirus HIV-a (stanice J-Lat), transkripcija provirusne DNA ne može započeti zbog toga što je virusni LTR promotor nedostupan staničnim komponentama potrebnim za transkripciju. Promotor se može aktivirati tretmanom s tumorskim faktorom nekroze α (TNFα, eng. *tumor necrosis factor α*). Sekvencioniranjem je utvrđeno da ako se stanice tretira s CRISPR-Cas9 i gRNA dolazi do nastanka mutacija, najčešće insercija i delecija *(insertion and deletion – indel)*. Nastale mutacije smanjuju virusnu gensku ekspresiju i replikaciju ako se naknadno aktivira TNFα. Ukoliko se LTR promotor aktivira s TNFα prije izlaganja stanica sustavu CRISPR-Cas9, nema dodatnog smanjenja ekspresija virusnih gena što znači da latentna provirusna struktura DNA ne utječe na djelovanje sustava CRISPR-Cas9. Sposobnost CRISPR-Cas9 da utječe na transkripcijski inaktivnu virusnu DNA ukazuje na mogućnost korištenja sustava za utišavanje integrirane virusne DNA u latentno inficiranim stanicama (Zhu *et al*. 2015).

U istraživanju Kaminski *et al*., 2016a, pokazano je da CRISPR-Cas9 može izrezati DNA HIV-a u transgeničnim miševima i štakorima. Za *in vivo* unošenje sustava CRISPR-Cas9 korišten je rekombinantni adenovirusni vektor s dvije molekule gRNA za prepoznavanje regije LTR, sekvencama Gag i molekulom saCas 9, što je zapravo kraća verzija proteina Cas9 izolirana iz *Staphylococcus aureus*. Vektor je unesen u transgeničnog miša kroz repnu venu i došlo je do izrezivanja integrirane virusne DNA i izrezivanja fragmenata DNA obuhvaćenih ciljnim mjestima molekula gRNA u limfocitima i u različitim tkivima. Osim toga, vektor je injiciran i u retro-orbitalnu venu transgeničnih štakora što je rezultiralo izrezivanjem ciljanih segmenata HIV-a i smanjilo ekspresiju virusnih gena u cirkulirajućim limfocitima. Analize lančanom reakcijom polimerazom (reakcija PCR, eng. *polymerase chain reaction*) pokazale su prisutnost izrezanih i kompletnih, neizrezanih genoma virusa HIV-a u različitim tipovima stanica. Iako autori nisu istražili razlog zbog kojeg genom HIV-a nije izrezan u pojedinim tipovima stanica, vrlo je vjerojatno da su ciljana mjesta bila mutirana.

Ova istraživanja pokazuju da tretman sustavom CRISPR-Cas9 može potaknuti mutacijsku inaktivaciju provirusne DNA. Ako se koristi jedna gRNA molekula ili dvije gRNA molekule koje imaju različita ciljna mjesta u genomu, moguća je inaktivacija provirusa

mutacijom ciljanih mjesta ili izrezivanjem regije između dva ciljna mjesta. Izrezivanje ovisi o istovremenom cijepanju na oba ciljna mjesta što zahtijeva sličnu kinetiku gRNA i Cas9 na njima. To se vjerojatno lakše postiže koristeći jednu gRNA molekulu koja ciljno napada ponavljajuće sekvence LTR, no postoje neka istraživanja koja pokazuju efikasnu eksciziju provirusa (Kaminski *et al*., 2016a), dok druga pokazuju da je osim ekscizije došlo i do mutacije (Ebina *et al*., 2013). Prema tome, postoje i drugi faktori koji utječu na proces, kao što su tip stanica, metoda kojom se unosi sustav CRISPR-Cas9 i razina ekspresije provirusnog genoma.

2.2. Intracelularna obrana protiv infekcije

Sustav CRISPR-Cas9 može se koristiti i kao obrana protiv *de novo* virusne infekcije HIV-a tako da se ciljno razgrađuje novosintetizirana dlDNA nastala reverznom transkripcijom. Postoje brojna istraživanja o mogućnosti korištenja proteina Cas9 i antivirusnih gRNA molekula za sprječavanje replikacije koja su pokazala da utječu na smanjenje infekcije. Pokazano je da T-limfociti s sustavom CRISPR-Cas9 reduciraju replikaciju virusa HIV-a prilikom infekcije, posebice ako se koriste dvije molekule gRNA (Liao *et al*., 2015; Kaminski *et al*., 2016a). Sustav CRISPR-Cas9 dokazano funkcionira i u stanicama koje su fiziološki važne kao spremnici virusa HIV-a (npr. monociti, makrofagi). To je pokazano ubacivanjem Cas9 i gena gRNA u ljudske pluripotentne matične stanice što je rezultiralo smanjenom ekspresijom virusnih gena u diferenciranim monocitima i makrofagima nakon infekcije. Razlog smanjenja virusne ekspresije gena u navedenim istraživanjima vjerojatno je posljedica djelovanja sustava CRISPR-Cas9 na virusnu DNA prije i nakon njene integracije (Kumar *et al*., 2014; Liao *et al*., 2015).

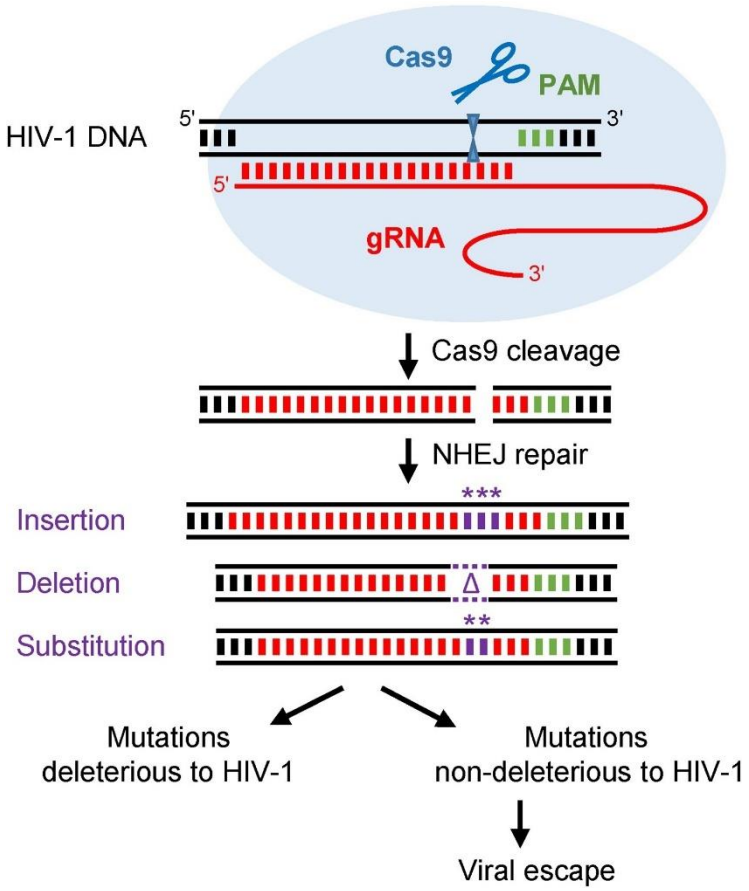
2.3. Izbjegavanje inhibicije

U velikom broju istraživanja korištene su stanične kulture koje su održavane relativno kratko vrijeme pa se iz njih ne može zaključiti može li HIV izbjeći inhibiciju sustavom CRISPR-Cas9. U istraživanju Wang *et al*., 2016b, replikacija virusa HIV-a testirana je u dugotrajnim kulturama T-limfocita u kojima je eksprimiran protein Cas9 i molekula gRNA koja je ciljala na regiju LTR ili protein-kodirajuće sekvence. Uočeno je da dolazi do inhibicije replikacije, ali je

period supresije varirao ovisno o gRNA te je u većini kultura naposljetku došlo do potpunog oslobađanja od inhibicije. Kapacitet gRNA za blokiranje replikacije nije ovisio o sposobnosti indukcije izrezivanja virusne DNA, već je pokazana korelacija između kapaciteta za blokiranje i stope konzerviranosti ciljanih sekvenci HIV-a. Prema tome, molekule gRNA koje djeluju na strogo konzervirane virusne sekvence su dulje inhibirale replikaciju HIV-a, u odnosu na gRNA molekule koje djeluju na slabije konzervirane sekvence.

U blizini mjesta izrezivanja od strane proteina Cas9 često se pojavljuju mutacije i to prvenstveno insercije i delecije što upućuje na to da na dlDNA lomove koje stvara protein Cas9 djeluje mehanizam popravka nehomolognog spajanja krajeva (eng. *non-homologous end-joining*, NHEJ). Taj mehanizam popravka može objasniti povezanost između kapaciteta gRNA da inhibira replikaciju i konzerviranih ciljanih sekvenci. Slabo konzervirane, neesencijalne regije genoma HIV-a češće nakupljaju insercije i delecije koje su posljedica popravka mehanizmom NHEJ. To objašnjava brzi nastanak generacije virusa koja je otporna na sustav CRISPR-Cas9 kada su te domene ciljana meta gRNA. Kada su ciljne sekvence konzervirani, esencijalni dijelovi virusnog genoma, tada insercije i delecije inhibiraju replikaciju i ne nastaje virus koji je otporan na sustav CRISPR-Cas9. Jedine mutacije esencijalnih dijelova genoma koje mogu rezultirati rezistentnim sojem virusa su supstitucije nukleotida, ali one ne nastaju često tijekom mehanizma NHEJ. U tom slučaju rezistentni virus može nastati zbog pogreške reverzne transkriptaze prilikom replikacije, ali je time već produženo vrijeme nastanka rezistentnog virusa.

Veći broj istraživanja pokazuje da sustav CRISPR-Cas9 inhibira replikaciju virusa HIV-a, ali da mehanizam nehomolognog spajanja krajeva kojim se spajaju novonastali krajevi DNA uzrokuje izbjegavanje inhibicije od strane virusa. U blizini mjesta izrezivanja proteinom Cas9 uočene su točkaste mutacije pa se stoga uloga reverzne transkriptaze u stvaranju mutiranih virusa ne može isključiti. Štoviše, slabo replicirajući virus nastao mehanizmom NHEJ, može akumulirati još dodatne pogreške u ciljnoj regiji prilikom replikacije (zbog nepreciznosti reverzne transkriptaze) zbog čega se može poboljšati sposobnost replikacije novonastalog virusa (Slika 2; Wang *et al*., 2017).



Slika 2. Shematski prikaz izbjegavanja inhibicije virusa HIV-a od strane Cas9/gRNA. Dvolančani lom koji stvara protein Cas9 se popravlja putem popravka NHEJ pri čemu nastaju mutacije koje većinom uzrokuju inaktivaciju virusa, ali u nekim slučajevima omogućuju izbjegavanje inhibicije. (Preuzeto iz: Wang *et al*., 2018)

2.4. Sprječavanje izbjegavanja inhibicije sustavom CRISPR-Cas9

Liječenje virusne infekcije HIV-a ima puno komplikacija zbog iznimne sposobnosti virusa da razvije rezistenciju na lijekove, a i na metode koje se temelje na RNA interferenciji, posebice ako se koristi samo jedan oblik terapije (Boden *et al*., 2003.). Slično kao što virus izbjegne inhibiciju od strane gRNA i proteina Cas9, rezistentni virus nastaje i prilikom napada nukleazama ZFN i TALEN (De Silva Feelixge *et al*., 2005). Antiretrovirusne terapije koje se trenutno koriste temeljene su na istovremenom korištenju različitih lijekova što sprječava razvoj otpornosti u pacijentima. Na sličan način, kombinacija metoda RNA interferencije inhibira replikaciju u staničnim kulturama kroz dulje vrijeme (ter Brake *et al*., 2006). Takve kombinacije

lijekova efikasne su zbog aditivnog ili čak sinergističkog efekta lijekova i zbog toga što tada za izbjegavanje inhibicije mora doći do mutacija na više različitih mjesta.

U istraživanju Wang *et al*., 2016a, određena je kombinacija dviju gRNA molekula koja je potpuno blokirala replikaciju virusa za vrijeme trajanja eksperimenta. Ciljne sekvence molekula bile su visoko konzervirane sekvence Gap, sekvence Tat/Rev ili sekvence za omotnicu (eng. *envelope*, Env). Nakon ponovljenog napada sustavom CRISPR-Cas9 na virus, s vremenom dolazi do nestajanja divljeg tipa virusa i virusa s točkastim mutacijama u kulturama. Istovremeno se povećava udio većih insercija i delecija te supstitucija većeg broja nukleotida na oba ciljna mjesta. Takve genetičke promjene na konzerviranim sljedovima onemogućuju daljnju replikaciju što znači da zbog pojave hipermutacija dolazi do inaktivacije provirusa. To potvrđuje da tretman stanica s proteinom Cas9 i dvije molekule gRNA može rezultirati sterilizacijom infektivnih molekula virusa HIV-a u uvjetima *in vitro*. Do sterilizacije je došlo nakon mjesec dana kada se koristila optimalna kombinacija gRNA molekula koje su ciljano djelovale na sekvence Gag i Tat/Rev. S druge strane, korištenjem druge najbolje kombinacije gRNA molekula, koje djeluju na gene Gag i Env, sterilizacija je nastupila tek nakon 3 mjeseca. Zatim je predloženo izrezivanje integriranog provirusa dvjema molekulama gRNA ili jednom molekulom gRNA koja ciljano djeluje na sljedove LTR. Došlo je do detekcije ekscizije, ali nije bila visoko efikasna, već je došlo do nastanka hipermutiranih provirusa koji se nisu mogli replicirati. Prema tome, kontinuirano djelovanje sustava CRISPR-Cas9 može izliječiti kulture stanica inficirane s virusom HIV-a, pri čemu u stanicama ostane velik broj inaktiviranih provirusa.

Sustav CRISPR-Cas9 može se kombinirati s antivirusnim lijekovima i metodom RNAi (Herrera-Carillo i Berkhout, 2016). Kombinacije metoda smanjuju razinu replikacije virusa i otežavaju virusu izbjegavanje represije. Istovremeni napad na virus sustavom CRISPR-Cas9 i metodom RNAi inhibira replikaciju HIV-a dulje nego kad se koristi samo jedna metoda (Wang *et al*., 2017). Izbjegavanje represije sustavom CRISPR-Cas9 smanjuje se i inhibicijom puta popravka NHEJ jer je upravo taj mehanizam odgovoran za stvaranje mutacija koje omogućuju preživljavanje virusa. Inhibicija tog puta popravka postiže se određenim lijekovima koji se koriste u kemoterapiji, npr. SCR7 (Singh *et al*., 2015). No, potrebno je utvrditi može li se inhibicija puta popravka NHEJ postići lijekovima bez da se nanosi šteta organizmu. Sustav CRISPR-Cas9 ciljano djeluje na mjesto 3 nukleotida uzvodno PAM regije koja je vrlo bitna za

prepoznavanje od gRNA (Cho *et al*., 2013). Put popravka NHEJ tada stvara mutirana ciljna mjesta koja sustav CRISPR-Cas9 više ne prepoznaje. Prema tome, Cas9 i slične nukleaze koje bi urezivale izvan gRNA veznog mjesta bi mogle spriječiti izbjegavanje inhibicije jer mutacije nastale putem popravka NHEJ (osim većih delecija) ne bi utjecale na ciljanu sekvencu. Kao alternativa, nukleaze kao što su Cpf1 koje izrezuju ciljna mjesta dalje od PAM sekvence, u regiji koja nije od tolike važnosti za vezanje gRNA, bi mogle smanjiti rezistenciju na gRNA i otežati izbjegavanje inhibicije virusu (Zetsche *et al*., 2015).

3. Ograničenja metode

Uspješna primjena tehnologije CRISPR-Cas9 u terapiji za liječenje HIV-a zahtjeva efikasan unos komponenata CRISPR sustava u inficirane stanice. Najpovoljnije bi bilo unijeti komponente u sve inficirane stanice, posebice one koje sadrže latentni virus ili sve stanice podložne infekciji. Slično kao i kod drugih genskih terapija, za unos transgena za protein Cas9 i gRNA, moguće je korištenje različitih virusnih vektora (npr. adenovirusni), no postoje i druge metoda unosa koje ne uključuju vektore, npr. lipidne nanočestice (Wang *et al*., 2017).

Elementi CRISPR trebali bi se unositi direktno u pacijenta i razvijene su metode za aplikaciju *in vivo*, no zbog ograničene efikasnosti trenutnih vektora, ne mogu se transformirati sve stanice (Yang *et al*., 2006). Postoji *ex vivo* tip genske terapije gdje se T-limfociti ili hematopoetske matične stanice izoliraju iz pacijenta i transduciraju vektorom *in vitro* i zatim injiciraju natrag u pacijenta (Biffi *et al*., 2013). Iako je ta metoda vjerojatnija, njome se promijeni samo mali udio inficiranih stanica, a terapija za liječenje HIV-a bi u idealnom slučaju trebala djelovati na sve inficirane stanice. Prema tome, potreban je razvoj novih, efikasnijih metoda unošenja elemenata CRISPR *in vivo*.

Problem kod unosa elemenata CRISPR je veličina spCas9 transgena (~4,1 kpb) što je problem ako virusni vektori imaju ograničen kapacitet pohrane genetičke informacije. Problem se može riješiti korištenjem manjeg Cas9 proteina (3,3 kpb) izoliranog iz drugih bakterija, npr. *Streptococcus thermophiles* (Fonfara *et al*., 2014) i *Staphylococcus aureus* (Ran *et al*., 2015). Također, može se koristiti skraćeni gen spCas9 kojem nedostaju neesencijalne sekvence kao što je domena REC2, no tada se aktivnost proteina smanji za 50% u odnosu na divlji tip (Nishimasu *et al*., 2014). Osim toga, može se koristiti sustav Cas9 u kojem su dvije ili tri funkcionalne domene proteina eksprimirane kao zasebni polipeptidi i tada se genetska informacija unosi s dva do tri vektora. No, efikasnost takvog sustava je smanjena jer u tom slučaju, da bi sustav CRISPR funkcionirao, u stanicu mora ući informacija sa svakog vektora (Truong *et al*., 2015).

Kod dizajniranja molekula gRNA potrebno je pripaziti da one efikasno prepoznaju DNA virusa HIV-a, pritom ne prepoznavajući staničnu DNA. Bioinformatičkim metodama biraju se molekule gRNA s visokom preciznošću (visoka *on-target* aktivnost, niska *off-target* aktivnost) (Doench *et al*., 2014), a njihova aktivnost se zatim mora provjeriti eksperimentalno, npr. u

staničnim kulturama. U istraživanju Wang *et al*., 2016b je pokazano da su sve *in silico* dizajnirane molekule gRNA uzrokovale izrezivanje virusne DNA i inhibiciju replikacije. No, sposobnost različitih gRNA da spriječe replikaciju virusa ne ovisi o njihovoj sposobnosti da izazovu izrezivanje DNA, već pokazuje visoku korelaciju sa stupnjem konzerviranosti ciljne sekvence. Prema tome, za sprječavanje izbjegavanja inhibicije, ciljna mjesta trebaju biti visoko konzervirane domene.

Off-targeting efekti mogu se izbjeći ograničavanjem aktivnosti sustava CRISPR-Cas9 na vrijeme koje je potrebno za inaktivaciju HIV-a. Aktivnost bi trebala biti regulirana nekim egzogenim efektorom. Pokazano je da se aktivnost sustava CRISPR-Cas9 može regulirati kada je Cas9 ili gRNA transgen kontroliran doksiciklin-inducibilnim sustavom genske ekspresije (Gonzalez *et al*., 2014). Osim toga, transkripcija gena Cas9 može se kontrolirati promotorom HIV koji se aktivira virusnim proteinom Tat pa se gen Cas9 eksprimira samo u inficiranim stanicama (Kaminski *et al*., 2016b).

4. Zaključak

Sustav CRISPR-Cas9 daje velike mogućnosti za liječenje virusnih bolesti kod ljudi. No, kako je velika većina dosadašnjih istraživanja provedena na stanicama u kulturi, potrebno je istražiti djelovanje CRISPR-Cas9 *in vivo*. Za efikasno uklanjanje virusa u uvjetima *in vivo* potreban je razvoj sustava CRISPR-Cas9 koji se mogu unijeti jednim vektorom, a za to je potrebno korištenje manjih i specifičnijih endonukleaza Cas9. No, iako još uvijek postoje brojne prepreke prije nego što bi se sustav CRISPR-Cas9 mogao primjenjivati na ljudima za liječenje HIV-a, nedvojbeno je da dosadašnja istraživanja ukazuju na veliki potencijal i mogućnosti u budućnosti.

5. Sažetak

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) i CRISPR-*associated* (Cas) sustav (CRISPR-Cas) je obrambeni menhanizam prokariota protiv invadirajućih molekula DNA. Danas se sustav CRISPR-Cas često koristi kao alat za uređivanje genoma eukariota, a može se koristiti i u liječenju virusnih infekcija, ako virusi imaju dlDNA genom ili repliciraju preko dvolančanog intermedijera. Virus humane imunodeficijencije (HIV) je retrovirus čija se genomska RNA prepisuje u dlDNA pa na taj način može biti meta sustava CRISPR-Cas. Mogu se liječiti već inficirane stanice, na način da se u stanicu uvode nukleaza Cas9 i gRNA čija je sekvenca komplementarna virusnoj pa napada provirusnu DNA. No, infekcije se mogu i unaprijed spriječiti uvođenjem nukleaze i molekule gRNA u stanice gdje očekuju potencijalan napad virusa. Liječenje infekcija uzrokovanih virusom HIV-a ima brojne komplikacije jer virus posjeduje iznimnu sposobnost razvijanja rezistencije na lijekove pa se preporuča kombinacija većeg broja terapija. Iako postoje brojne prepreke prije nego što bi se sustav CRISPR-Cas mogao primjenjivati na ljudima (unos komponenata u stanice, *off-targeting*), dosadašnja istraživanja ukazuju na velik potencijal ove metode.

6. Summary

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) and CRISPR-*associated* (Cas) system (CRISPR-Cas) is a prokaryotic immune system against invading DNA. Today, it is commonly used as a genome editing tool, but it is also a frequent method for treating viral infections. That is possible when a virus has a dsDNA genome or if it replicates through a double-stranded intermediate. Human immunodeficiency virus (HIV) is a retrovirus and its genomic RNA is transcribed into a double-stranded DNA molecule and that is why HIV is a possible target of CRISPR-Cas. With the method, it is possible to treat previously infected cells by introducing Cas9 nuclease and a gRNA molecule with sequence complementarity to HIV into infected cells to attack the proviral DNA. In a second approach, it is possible to introduce Cas9 and gRNA into uninfected cells to await and immediately attack dsDNA that is produced upon a future infection. Treatment of HIV infections has many complications due to the virus' amazing ability to acquire resistance. For this reason, it is recommended to use multiple different therapies at the same time. Even though there are still many obstacles to overcome before CRISPR-Cas could be successfully applied in patients, current research shows incredible potential of the method.

7. Literatura

Amitai G., Sorek R. 2016. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. Nat Rev Microbiol 14, 67-76

Biffi, A. *et al*. 2013. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. Science 341, 864-877

Blankson, J.N., Persaud, D., Siliciano, R.F. 2002. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. Annu Rev Med 53, 557-593

Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L., Ramratnam, B. 2003. Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. J Virol 77, 11531-11535

Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., Kim, J.S. 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat Biotechnol 31, 230-232

Cornu, T.I., Musolino, C., Bloom, K., Cathomen, T. 2015. Editing CCR5: a novel approach to HIV gene therapy. Adv Exp Med Biol 848, 117-130

De Silva Feelixge, H.S. *et al*. 2016. Detection of treatment-resistant infectious HIV after genome-directed antiviral endonuclease therapy. Antiviral Res 126, 90-98

Dean, M. *et al*. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Science 273, 1856-1862

Doench, J.G. *et al*. 2014. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. Nat Biotechnol 32, 1262-1267

Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y. 2013. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. Sci Rep 3, 2510

Fonfara, I. *et al*. 2014. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Res 42, 2577-2590

Gonzalez, F. *et al*. 2014. An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 15, 215-226

Herrera-Carrillo, E., Berkhout, B. 2016. Attacking HIV-1 RNA versus DNA by sequence-specific approaches: RNAi versus CRISPR-Cas. Biochem Soc T 44, 1355-1365

Hu, W. *et al*. 2014. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. Proc Natl Acad Sci USA 111, 11461-11466

Hutter, G. *et al*. 2009. Longterm control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. N Engl J Med 360, 692-698

Jinek, M. *et al*. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. eLife 2, e00471

Johnson, T.P. *et al*. 2013. Induction of IL-17 and nonclassical T-cell activation by HIV-Tat protein. Proc Natl Acad Sci USA 110, 13588-13593

Kaminski, R. *et al*. 2016a. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. Sci Rep 6, 22555

Kaminski, R. *et al*. 2016b. Negative Feedback Regulation of HIV-1 by Gene Editing Strategy. Sci Rep 6, 31527

Karpinski, J. *et al*. 2016. Directed evolution of a recombinase that excises the provirus of most HIV-1 primary isolates with high specificity. Nat biotechnol 34, 401-409

Kumar, A., Abbas, W., Herbein, G. 2014. HIV-1 latency in monocytes/macrophages. Viruses 6, 1837-1860

Liao, H.K. *et al*. 2015. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. Nat Commun 6, 6413

Maraffini, L.A. 2015. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. Nature 526, 55–61

Mohanraju, P. *et al*. 2016. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. Science 353, 556-568

Mojica, F.J. *et al*. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J Mol Evol 60, 174–182

Nishimasu, H. *et al*. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Cell 156, 935-949

Park, R.J. *et al*. 2017. A genomewide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors. Nat Genet 49, 193-203

Ran, F.A. *et al*. 2015. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. Nature 520, 186-191

Singh, P., Schimenti, J.C., Bolcun-Filas, E. 2015. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. Genetics 199, 1-15

Soppe, J.A., Lebbink, R.J. 2017. Antiviral goes viral: Harnessing CRISPR/Cas9 to combat viruses in humans. Trends Microbiol 25, 833-850

ter Brake, O., Konstantinova, P., Ceylan, M., Berkhout, B. 2006. Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach. Mol Ther 14, 883-892

Truong, D.J. *et al*. 2015. Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy. Nucleic Acids Res 43, 6450-6458

Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., Das, A.T. 2016a. A combinatorial CRISPR-Cas9 attack on HIV-1 DNA extinguishes all infectious provirus in infected T cell cultures. Cell Rep 17, 2819-2826

Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., Das, A.T. 2016b. CRISPR-Cas9 can inhibit HIV-1 replication but NHEJ repair facilitates virus escape. Mol Ther 24, 522-526

Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., Das, A.T. 2018. CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. Virus Res 244, 321-332

Yang, L., Bailey, L., Baltimore, D., Wang, P. 2006. Targeting lentiviral vectors to specific cell types in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 103, 11479-11484

Yosef, I. *et al*. 2012. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res 40, 5569–5576

Zetsche, B. *et al*. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell 163, 759-771

Zhu, W. *et al*. 2015. The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. Retrovirology 12, 22