

CRISPR/CAS9 JAKO NOWA METODA W WALCE Z HIV – PERSPEKTYWY I HISTORIA ROZWOJU

CRISPR/CAS9 AS A NEW METHOD IN THE FIGHT AGAINST HIV – PERSPECTIVES AND HISTORY OF DEVELOPMENT

Aleksandra WITKOWSKA¹, Agata KIEREPA², Arleta KOWALA-PIASKOWSKA², Iwona MOZER-LISEWSKA²

¹Studenckie Towarzystwo Naukowe Katedry i Kliniki Chorób Zakaźnych, Hepatologii i Nabytych Niedoborów Odporności, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

²Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych, Hepatologii i Nabytych Niedoborów Odporności, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS) wciąż pozostaje poważnym problemem w zakresie zdrowia publicznego. Główną przeszkodą w eradykacji HIV jest latentny rezerwuuar wirusa, który utrzymuje się pomimo długotrwałej, wysoce aktywnej terapii antyretrowirusowej (HAART). Terapia może obniżyć wiramię do niewykrywalnego poziomu, jednak posiada takie ograniczenia, jak problemy z adhezją chorych do wieloletniej terapii, krótko- i długoterminowe skutki uboczne, interakcje lekowe, wysokie koszty i możliwość pojawienia się oporności na leki. Ponadto dostępne leki nie dają możliwości całkowitego wyleczenia z infekcji HIV, a ich odstawienie prowadzi do szybkiego wzrostu wirēmii. W niniejszej pracy przedstawione zostały wyniki wstępnych badań z zastosowania systemu CRISPR/Cas9 w celu wyeliminowania DNA HIV z genomu zainfekowanych komórek. Ogromną zaletą narzędzia do edycji genomu CRISPR/Cas9 jest łatwość zaprojektowania prowadzącego RNA (ang. *guide RNA*), który kieruje Cas9 do wyznaczonego locus DNA oraz wysoka specyficzność i skuteczność tego narzędzia. Możliwe jest, że CRISPR/Cas9 można łączyć z HAART w celu usunięcia wirusa z latentnie zainfekowanych komórek, czego nie daje się osiągnąć stosując tylko HAART. Mogłaby to być również ostatnia szansa na wyleczenie osób, u których zawiodła klasyczna terapia antyretrowirusowa. Jednak CRISPR/Cas9 ma też pewne ograniczenia. W związku z tym, myśląc o ulepszeniu metody, należy mieć na uwadze testowanie różnych wektorów i miejsc docelowych w genomie HIV oraz badania chemiczne indukcyjnych systemów Cas9, które mogłyby poprawić profil bezpieczeństwa.

Słowa kluczowe: HIV, AIDS, CRISPR/Cas9, latentny rezerwuuar wirusa

Summary: An Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) remains a serious public health problem. The main obstacle to HIV eradication is the latent virus reservoir, which persists despite long-lasting, highly active antiretroviral therapy (HAART). Therapy may reduce viral load to an undetectable level, but has limitations such as problems with adherence of patients to long-term therapy, short- and long-term side effects, drug interactions, high costs and the possibility of drug resistance. In addition, the available drugs do not allow complete cure from HIV infection, and withdrawal leads to a rapid increase of viral load. This article presents the results of preliminary studies on the use of the CRISPR/Cas9 system to eliminate HIV DNA from the genome of infected cells. The great advantage of the CRISPR/Cas9 genome editing tool is the ease of designing the RNA guide that directs Cas9 to the designated DNA locus and the high specificity and effectiveness of this tool. It is possible that CRISPR/Cas9 can be combined with HAART to remove the virus from latently infected cells, which can not be achieved by using only HAART. This could be the last chance to cure people who have failed classical antiretroviral therapy. However, CRISPR/Cas9 has also some limitations. Therefore, when thinking about improving the method, we should keep in mind the testing of various vectors and targets in the HIV genome and the chemical testing of inductive Cas9 systems that could improve the safety profile.

Keywords: HIV, AIDS, CRISPR/Cas9, latent reservoir of the virus

WSTĘP

Zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS) wciąż pozostaje poważnym problemem w zakresie zdrowia publicznego. Ponad 35 milionów osób na całym świecie jest zakażonych wirusem HIV-1, a częstość występowania nowych infekcji utrzymuje się na stałym poziomie i nowe zakażenia są wykrywane u około 2 milionów osób rocznie. Główną przeszkodą w eradykacji HIV jest latentny rezerwuuar wirusa, który utrzymuje się pomimo długotrwałej, wysoce aktywnej terapii antyretrowirusowej (HAART). Terapia może obniżyć wiramię do niewykrywalnego poziomu, jednak posiada takie ograniczenia, jak problemy z adhezencją chorych do wieloletniej terapii, krótko- i długoterminowe skutki uboczne, interakcje lekowe, wysokie koszty i możliwość pojawienia się oporności na leki. Ponadto dostępne leki nie dają możliwości całkowitego wyleczenia z infekcji HIV, a ich odstawienie prowadzi do szybkiego wzrostu wirēmii. Powodem istnienia latentnie zainfekowanych komórek jest to, że prowirusowy DNA integruje się z genomem gospodarza. Na spotkaniu AIDS 2016 w Durbanie, Kamel Khalili z Temple University przedstawił wyniki pokazujące, że przy pomocy systemu CRISPR/Cas9 można wyciąć DNA HIV z zainfekowanych komórek *in vitro*, *ex vivo* (przy użyciu próbek krwi pacjenta) i *in vivo* (używając transgenicznych myszy) [10]. Ogromną zaletą narzędzia do edycji genomu CRISPR/Cas9 jest łatwość zaprojektowania prowadzącego RNA (ang. *guide RNA*), który kieruje Cas9 do wyznaczonego locus DNA oraz wysoka specyficzność i skuteczność tego narzędzia. Inne, oparte na nukleazach technologie edytowania genów, takie jak nukleazy z motywem palca cynkowego (ang. *Zinc Finger Nucleases*, ZFN) czy nukleazy efektorowe

podobne do aktywatora transkrypcji (ang. *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*, TALEN), także dostarczają skutecznych narzędzi do ablacji konkretnych genów [26], jednak ich zaprojektowanie i rozwijanie jest trudne i czasochłonne [24]. CRISPR (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* – zgrupowane, regularnie przerywane krótkie powtórzenia palindromiczne)/Cas9 odkryto u bakterii jako mechanizm adaptacyjnej odporności przeciwko infekcji bakteriofagami [30]. W tym systemie RNA wykorzystywane jest jako przewodnik do kierowania endonukleazy Cas9 do DNA bakteriofaga, który jest następnie cięty i rozkładany [30]. Skuteczna adaptacja systemu CRISPR/Cas9 do komórek ssaków oznaczałaby nową erę inżynierii genomu.

POCZĄTKI TERAPII GENOWEJ W KONTEKŚCIE HIV

Zainteresowanie terapią genową zaczęło się od identyfikacji CCR5 jako głównego koreceptora dla HIV i naturalnie występującej u ludzi, homozygotycznej mutacji CCR5- Δ 32 (usunięcie 32 pary zasad na obu allelach genu), która daje oporność na zakażenie CCR5-tropowymi szczepami wirusa [13]. Z kolei, u osób z mutacją CCR5- Δ 32 w układzie heterozygotycznym obserwuje się opóźnienie progresji choroby [6]. Koreceptor CCR5 znajduje się m.in na powierzchni efektorowych komórek T, komórek T pamięci, komórek B i NK, makrofagów, monocytów i komórek dendrytycznych. Badania wykazały, że do wniknięcia wirusa HIV do komórek, oprócz glikoproteiny CD4 konieczna jest obecność przynajmniej jednego koreceptora, receptora chemokin CCR5 (dla beta-chemokin) lub CXCR4 (dla alfa-chemokin). [9]. Biorąc pod uwagę tropizm wirusa, wyróżnia się dwa zasadnicze szczepy HIV: M-tropowe (R5), które wykazują tropizm do CCR5 i dominują w początkowym okresie zakażenia oraz T-tropowe (X4), wykazujące tropizm do CXCR4 i pojawiające się w późnym okresie zakażenia. Od czasu identyfikacji koreceptora CCR5, koncerny farmaceutyczne skupiły się na rozwijaniu leków antyretrowirusowych wykorzystujących mechanizm działania inhibitorów wejścia i inhibitorów fuzji [4]. Jednym z tych leków jest Maraviroc, który przyłącza się do CCR5, blokując go i uniemożliwiając tym samym przyłączenie cząsteczki wirusa [3]. Jednak blokując tylko koreceptor CCR5, Maraviroc nie jest skuteczny wobec X4-tropowych szczepów wirusa. Do ponownego zainteresowania terapią genową doprowadził znaczący sukces w leczeniu tak zwanego „pacjenta z Berlina”. U pacjenta rozpoznano zakażenie HIV w 1995 roku, po czym włączono u niego terapię antyretrowirusową. W 2007 roku u mężczyzny rozwinęła się ostra białaczka szpikowa, a dwa lata później przeszczepiono mu szpik kostny od homozygotycznego dawcy CCR5- Δ 32. Dzięki temu, pacjent został wyleczony z infekcji HIV-1, wykazując tym samym potencjalne korzyści z zakłócenia CCR5 [1]. Jest to jedyny do tej pory na świecie, opisany przypadek

pacjenta, którego wyleczono z infekcji HIV. Jednak ze względu na niską częstość występowania homozygot CCR5-Δ32 w populacji ogólnej i trudności ze znalezieniem odpowiednich dawców zgodnych w układzie HLA, poszukiwane są alternatywne metody sztucznego zakłócenia CCR5.

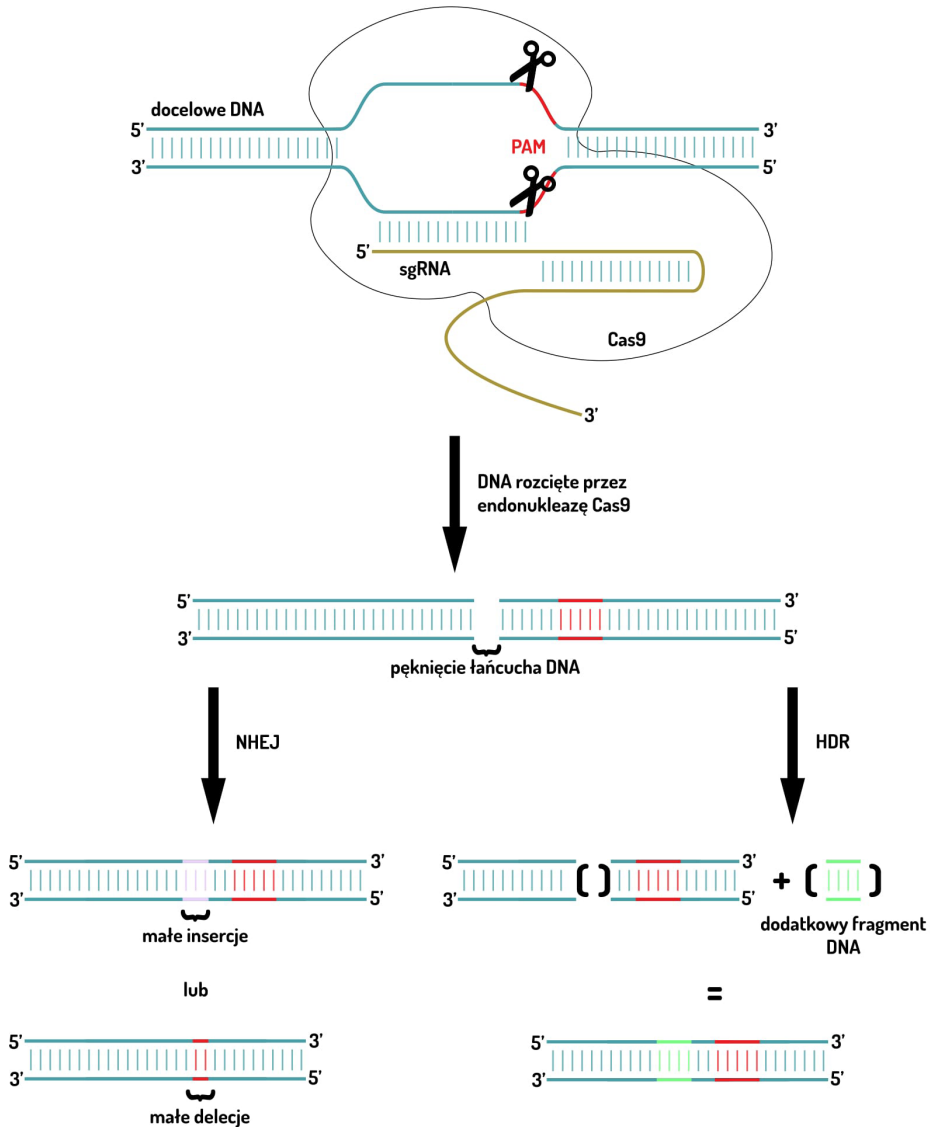
NUKLEAZY Z MOTYWEM PALCA CYNKOWEGO I NUKLEAZY EFEKTOROWE PODOBNE DO AKTYWATORA TRANSKRYPCJI

Pierwsze doniesienie o zastosowaniu nukleaz z motywem palca cynkowego w celu modyfikacji genu CCR5 w komórkach T CD4⁺ zostało opisane w 2008 roku [23]. Później jeszcze inne systemy nukleazowe zostały opracowane i przetestowane pod kątem ich zdolności do trwałego zakłócenia ekspresji CCR5. Znalazły się wśród nich m.in. nukleazy efektorowe podobne do aktywatora transkrypcji (TALEN). ZFN i TALEN są to sztucznie utworzone enzymy restrykcyjne, które umożliwiają szeroki zakres modyfikacji genetycznych poprzez indukcję przerw w podwójnej nici DNA (ang. *Double-Strand Breaks*, DSB), który jest następnie naprawiany w podatnym na błędy mechanizmie scalania niehomologicznych zakończeń DNA (ang. *Non-Homologous End Joining* machinery, NHEJ) [31] lub mechanizmie naprawy rekombinacyjnej (ang. *Homology-Directed Repair*, HDR) [5]. ZFN powstały w wyniku połączenia domeny białkowej palca cynkowego, który wiąże się z nicią DNA, z niespecyficzną domeną przecinającą nić DNA [8]. Swoista specyfika zaprojektowanej domeny palca cynkowego umożliwia rozpoznawanie konkretnej sekwencji DNA i przyłączenie się określonej nukleazy do unikatowych sekwencji w genomie. Z kolei TALEN składają się z połączonych domen wiążących DNA pochodzących od białek TALE z domeną rozszczepiającą nić DNA. TALEN zbudowane są z wielu domen zawierających 33-35 powtórzeń aminokwasowych, z których każda rozpoznaje pojedynczą parę zasad [2]. W przypadku zakażenia HIV-1, każda z tych nukleaz wykazała skuteczność w zakłóceniu genu CCR5, która wynosiła około 45%, ale posiadała również pewne wady [22]. TALEN wywoływały znacznie niższą cytotoksyczność i efekty uboczne w porównaniu z ZFN, jednak przeszkodą okazał się relatywnie duży rozmiar białka TALEN. Komórki eukariotyczne wykorzystują dwie główne metody naprawy DSB. Pierwszą z nich jest NHEJ, który jest aktywny we wszystkich fazach cyklu komórkowego [21]. Główne białka biorące udział w NHEJ to heterodimeryczne białko Ku (Ku70/Ku80), katalityczna podjednostka DNA-zależnej kinazy białkowej (DNA-PK) oraz kompleks ligazy DNA IV składający się z katalitycznej podjednostki i jej kofaktora XRCC4 [31]. Uszkodzenie o charakterze DSB wykrywane jest przez białko Ku, które rekrutuje katalityczną podjednostkę

DNA-zależnej kinazy białkowej do miejsca uszkodzenia i tworzy aktywny kompleks DNA-PK. Następnie dochodzi do rekrutacji i aktywacji enzymów przetwarzających końce DNA: polimeraz i ligazy DNA IV. Natomiast metoda HDR pozwala na naprawę uszkodzonego chromosomu przy udziale siostrzanej chromatydy bądź chromosomu homologicznego jako wzoru. HDR działa tylko w fazie S/G2 cyklu komórkowego, ponieważ w tej fazie dostępne są chromatydy siostrzane [21]. HDR umożliwia precyzyjną modyfikację genów, jest jednak mało wydajny. NHEJ jest bardziej efektywny, jednak prowadzi do insercji i delecji, często zaburzających funkcję DNA.

MECHANIZM DZIAŁANIA I ZASTOSOWANIE SYSTEMU CRISPR/Cas9

Główną przeszkodą w systemach ZFN i TALEN jest kosztowna i czasochłonna inżynieria docelowych, specyficznych dla genu białek fuzyjnych [11]. Z tego względu niedawno zainteresowanie wzbudziło nowe, łatwe w zaprojektowaniu i wszechstronne w użyciu narzędzie do edycji genomu określane jako CRISPR/Cas9. CRISPR jest systemem obrony organizmów prokariotycznych przed bakteriofagami i plazmidami. Pod koniec lat 80, naukowcy zaobserwowali sekwencje niepowtarzalnych, krótkich powtórzeń palindromowych w genomie *E. coli*, a nieco później także u innych bakterii i archeonów [14], jednak w tamtym czasie ich funkcja nie była jeszcze poznana. System CRISPR wykorzystuje elementy mechanizmu nabytej odporności bakterii i archeonów na infekcję fagami i transformację obcym materiałem genetycznym. Mikroorganizmy włączają do loci CRISPR w swoim genomie fragmenty obcego DNA, co umożliwia w przyszłości szybkie rozpoznanie i zwalczenie infekcji [29]. W działaniu systemu CRISPR/Cas można wyróżnić trzy zasadnicze etapy: adaptację, ekspresję i interferencję. Podczas adaptacji, krótki fragment pochodzący z wirusowego lub plazmidowego DNA (tzw. protospacer) jest cięty na małe fragmenty i włączany do locus CRISPR w serii krótkich powtórzeń. Loci są transkrybowane, a transkrypty są następnie przetwarzane w celu wytworzenia małych RNA (crRNA-CRISPR RNA). W celu uzyskania specyficznego dla miejsca rozpoznania DNA, a następnie jego cięcia, Cas9 musi być skompleksowany zarówno z crRNA, jak i z oddzielnym transaktywującym crRNA (tracrRNA lub trRNA), który jest częściowo komplementarny do crRNA [20]. TracrRNA jest niezbędny do dojrzewania crRNA z pierwotnego transkrypty kodującego wiele pre-crRNA. Opracowano uproszczony system dwuskładnikowy, łączący crRNA i tracrRNA w pojedynczy syntetyczny przewodnikowy RNA (ang. *single guide RNA*, sgRNA). W systemie CRISPR/Cas9 endonukleaza Cas9 przyłącza się do docelowego DNA dzięki sgRNA. Dwudziestonukleotydomowa sekwencja na końcu 5' sgRNA wiąże się z docelowym DNA poprzez łączenie par zasad (Watson-Crick) [28].



RYCINA 1. Schemat działania CRISPR/Cas9. Endonukleaza Cas9 sprzężona z crRNA i trRNA lub z syntetycznym sgRNA będącym ich połączeniem, przecina podwójną nić DNA w miejscu komplementarnym do sekwencji sgRNA, sąsiadującym z sekwencją PAM. Następnie, podwójne pęknięcie jest naprawiane w jednym z dwóch możliwych mechanizmów – nieprecyzyjnym ale częstszym i bardziej wydajnym NHEJ lub możliwym do kontrolowania, precyzyjnym, bardziej wymagającym HDR.

FIGURE 1. The CRISPR/Cas9 operation scheme. Cas9 endonuclease coupled to crRNA and trRNA or to synthetic sgRNA being a combination of these, cuts the double strand of DNA in a place complementary to the sgRNA sequence adjacent to the PAM sequence. Then, the double strand break is repaired in one of two possible mechanisms – imprecise but more frequent and more efficient NHEJ system or controllable, precise and more demanding HDR system

Cas9 to endonukleaza, zawierająca dwie domeny nukleazowe: domenę HNH oraz RuvC, która rozszczepia dwuniciowy DNA w specyficzny dla sekwencji sposób [30]. Każda z tych domen odpowiada za trawienie jednej nici DNA. Domena HNH rozszczepia komplementarną nić, podczas gdy domena RuvC rozszczepia nić niekomplementarną. Kierowana przez sgRNA, Cas9 musi rozpoznać wielonukleotydowy region sąsiadujący z końcem 3' docelowego DNA, nazywany sekwencją PAM (ang. *Protospacer Adjacent Motif*) [17]. Wiąże się z docelowymi loci sąsiadującymi z sekwencją PAM, a następnie generuje specyficzne dla miejsca pęknięcia podwójnej nici DNA, która są naprawiane w mechanizmie NHEJ [31] lub mechanizmie HDR [5]. Obecnie projektowane są nowe cząsteczki sgRNA, których celem jest rozpoznawanie konkretnych sekwencji. Mechanizm działania systemu CRISPR/Cas9 został zaprezentowany na rycinie 1.

Ostatnio, w kilku badaniach zastosowano CRISPR/Cas9 do skutecznego modulowania alleli odpowiedzialnych za powstawanie choroby na modelach zwierzęcych *in vivo*, m.in. w β -talasemii i anemii sierpowatej [15] oraz *ex vivo* w somatycznych, indukowanych, pluripotencjalnych komórkach macierzystych [12]. Wstrzyknięcie komponentów CRISPR/Cas9 do zygoty lub wczesnego stadium zarodka pozwala na modyfikację genomu we wszystkich komórkach organizmu, w tym linii zarodkowej [25]. Prowadzi to do trwałych zmian, które można przekazywać następnym pokoleniom, dając tym samym możliwość wyeliminowania choroby genetycznej z całej rodziny [25]. System Cas9/gRNA może być także stosowany do hamowania ludzkich patogennych wirusów DNA, takich jak wirus zapalenia wątroby typu B, wirus Epstein-Barr czy wirus brodawczaka ludzkiego [19].

CRISPR/Cas9 JAKO NARZĘDZIE DO EDYCJI GENÓW HIV

W sierpniu 2013 zostało opublikowane pierwsze doniesienie dotyczące zastosowania CRISPR-Cas9 w celu edycji genu HIV *in vitro*. W wyniku tego rozszczepiono lub zmutowano sekwencje długich końcowych powtórzeń (ang. *Long Terminal Repeat*, LTR), co zablokowało możliwość ekspresji genów wirusa, zarówno aktywnego transkrypcyjnie jak i latentnego [7]. Ponadto usunięto również wewnętrzne geny wirusowe w genomie gospodarza [19]. Korzystając z technologii edycji genomu naukowcy testują obecnie dwie strategie wyeliminowania utajonego zakażenia HIV [25]. W pierwszej metodzie, sekwencja genomu wirusa jest traktowana przez nukleazy, aby trwale wyeliminować zintegrowany DNA HIV z genomu zainfekowanych komórek [25]. Wyselekcjonowano 19 różnych gRNA (guide RNA), które miałyby dotrzeć z wysoką skutecznością do DNA HIV i nie wywierać przy tym efektów ubocznych [27]. Znalazły się wśród nich takie gRNA, które celowałyby m.in. w długie końcowe powtórzenia (LTR), dodatkowy gen Nef, sekwencje kodujące inne białka wirusowe (dobrze zachowane domeny w genach Gag, Pol i Env i sekwencje nakładających się ramek odczytu jak geny Tat i Rev), wysoce konser-

watywne sekwencje wśród różnych izolatów HIV-1 oraz mniej konserwatywne domeny HIV [27]. Liao i współbadacze niedawno stosowali takie podejście przy użyciu CRISPR/Cas9 i celowali w wysoce konserwatywne długie końcowe powtórzenia HIV-1 (LTR) w pierwotnie zainfekowanych komórkach CD4+ [18]. Stabilna ekspresja wektorów bazujących na CRISPR/Cas9 skierowanych do regionu LTR spowodowała ich zakłócenia, a następnie zmniejszenie produkcji wirusa i eliminację utajonego rezerwuaru [18]. Jednak hamowanie replikacji wirusa za pomocą CRISPR/Cas9 wykazano jedynie w krótkotrwałych badaniach eksperymentalnych, a wiemy, że HIV może uciec od większości, jeśli nie od wszystkich typów inhibitorów, w tym małowcząsteczkowych leków przeciwwirusowych [27]. Natomiast w drugim podejściu, edytowanie genomu jest stosowane do zwalczania HIV przez modulowanie receptora chemokin 5 (CCR5), koreceptora niezbędnego dla R5 i R5X4 HIV, aby wniknąć do komórek docelowych [32].

PODSUMOWANIE

Badania nad skutecznością i ulepszeniem metody wykorzystującej CRISPR/Cas9 w celu wyeliminowania DNA HIV z genomu zainfekowanych komórek są przez cały czas prowadzone. Kamel Khalili zaprezentował wyniki ukazujące, że dzięki tej metodzie jest możliwe całkowite i trwałe usunięcie HIV [10]. U osób, u których klasyczna terapia antyretrowirusowa okazała się nieskuteczna, byłaby to ostatnia szansa na ich wyleczenie. Ponadto stosując tylko HAART, nie da się usunąć wirusa z latentnie zainfekowanych komórek. Możliwe jest, że można łączyć CRISPR/Cas9 z HAART, aby to przezwyciężyć [17]. Jednak CRISPR/Cas9 ma też pewne ograniczenia. Po pierwsze, HIV szybko mutuje, a nowym mutacjom sprzyja także mechanizm naprawczy NHEJ. Powoduje to zanik homologii wirusa z wprowadzonym sgRNA, w efekcie czego endonukleaza Cas9 nie może przyłączyć się do docelowego DNA. Po drugie, pomimo faktu, że CRISPR/Cas9 okazał się skuteczny w wycięciu prowirusowego DNA HIV-1, zarówno z ostro jak i przewlekle zainfekowanych komórek, żadne z badań nie testowało zdolności CRISPR/Cas9 w kontekście nieaktywnych komórek T CD4+ od osób zakażonych [17]. Ponadto, supresja replikacji HIV w zależności od sgRNA jest prawdopodobnie mniej wyraźna w porównaniu z obecnymi terapiami wykorzystującymi małowcząsteczkowe inhibitory [16]. W związku z tym, myśląc o ulepszeniu metody opartej na CRISPR/Cas9, należy mieć na uwadze testowanie różnych wektorów i miejsc docelowych w genomie HIV, a także badania chemiczne indukcyjnych systemów Cas9, które mogłyby poprawić profil bezpieczeństwa [10]. W tym celu niezbędne jest przeprowadzenie badań klinicznych.

LITERATURA

- [1] ALLERS K, HÜTTER G, HOFMANN J ET AL. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation. *Blood* 2011; **117**: 2791-2795.
- [2] BOCH J, SCHOLZE H, SCHORNACK S ET AL. Breaking the Code of DANN Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science* 2009; **326** (5959): 1509-1512.
- [3] Charakterystyka produktu leczniczego Celsentri. European Medicines Agency (online), http://www.ema.europa.eu/docs/pl_PL/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/000811/WC500022191.pdf, [download: 18.12.2017].
- [4] CORNU T, MUSSOLINO C, BLOOM K ET AL. Editing CCR5: a novel approach to HIV gene therapy. *Adv Exp Med Biol* 2015; **848**: 117-125.
- [5] DAI WJ, ZHU LY, YAN ZY ET AL. CRISPR- Cas9 for in vivo Gene Therapy: Promise and Hurdles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2016; **5**: 1-3.
- [6] DEAN M, CARRINGTON M, WINKLER C. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 1996; **273**: 1856-1861.
- [7] EBINA H, MISAWA N, KANEMURA Y ET AL. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep* 2013; **3**: 1-6.
- [8] GAJ T, GERSBACH CA, BARBAS CF 3RD. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas- based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 2013; **31**(7): 397-402.
- [9] GU WG, CHEN XQ. Targeting CCR5 for anti-HIV research. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; **33**: 1881-1883.
- [10] HARPER KN. New research on using CRISPR/ Cas9 to treat HIV. *AIDS* 2017; **31**(4): N7.
- [11] HSU PD, LANDER ES, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014; **157**(6): 1262-1274.
- [12] HU X. CRISPR/Cas9 system and its applications in human hematopoietic cells. *Blood Cells Mol Dis* 2016; **62**: 6-10.
- [13] HÜTTER G, NOWAK D, MOSSNER M. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/ Delta32 Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 2009; **360**: 692-695.
- [14] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K ET AL. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia Coli, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 1987; **169**: 5429-5433.
- [15] KIM EJ, KANG KH, JU JH. CRISPR- Cas9: a promising tool for gene editing on induced pluripotent stem cells. *Korean J Intern Med* 2017; **32**: 42-55.
- [16] LEBBINK RJ, DE JONG DC, WOLTERS F ET AL. A combinational CRISPR/ Cas9 gene- editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape. *Sci Rep* 2017; **7**: 1-5.
- [17] LIANG C, WAINBERG MA, DAS AT, BERKHOUT B. CRISPR/ Cas9: a double-edged sword when used to combat HIV infection. *Retrovirology* 2016; **13**(1): 37.
- [18] LIAO HK, GU Y, DIAZ A ET AL. Use of the CRISPR/ Cas9 system as an intracellular defense against HIV- 1 infection in human cells. *Nat Commun* 2015; **6**: 1-8.
- [19] LU XJ, XUE HY, KE ZP ET AL. CRISPR/Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet* 2015; **52**: 290-294.
- [20] MA Y, ZHANG L, HUANG X. Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J* 2014; **281**(23): 5186-5192.
- [21] MATSUMOTO Y. Smart choice between two DNA double-strand break repair mechanisms. *Igaku Butsuri* 2014; **34**(2): 57-63.

- [22] MUSSOLINO C, ALZUBI J, FINE EJ ET AL. TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity. *Nucleic Acids Research* 2014; **42**(10): 6762-6771.
- [23] PEREZ EE, WANG J, MILLER JC ET AL. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2008; **26**(7): 808-814.
- [24] ROGERS GL, CANNON PM. Gene Therapy Approaches to Human Immunodeficiency Virus and Other Infectious Diseases. *Hematol Oncol Clin North Am* 2017; **31**: 883-895.
- [25] SAVIĆ N, SCHWANK G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Transl Res* 2016; **168**: 15-19.
- [26] SWAMY MN, WU H, SHANKAR P. Recent advances In RNAi- based strategies for therapy and prevention of HIV-1/ AIDS. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; **103**: 174-180.
- [27] WANG G, ZHAO N, BERKHOUT B, DAS AT. CRISPR/Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. *Mol Ther* 2016; **24**: 522-525.
- [28] WANG Z, PAN Q, GENDRON P ET AL. CRISPR- Cas9- Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Rep* 2016; **15**: 481-485.
- [29] WESTRA ER, SWARTS DC, STAALS RH ET AL. The CRISPRs, they are a-changin': how prokaryotes generate adaptive immunity. *Annu Rev Genet* 2012; **46**: 311-330.
- [30] WIEDENHEFT B, STERNBERG SH, DOUDNA JA. RNA- guided genetic silencing systems in bacteria and arachnea. *Nature* 2012; **482**: 331-336.
- [31] WILLIAMS GJ, HAMMEL M, RADHAKRISHNAN SK ET AL. Structural insights into NHEJ: building up an integrated picture of the dynamic repair super complex, one component and interaction at a time. *DNA Repair (Amst)* 2014; **17**: 110-118.
- [32] XU L, YANG H, GAO Y ET AL. CRISPR-Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Mol Ther* 2017; **25**: 1782-1789.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 03.12.17

Przyjęto: 30.12.17

Aleksandra Witkowska

*Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych, Hepatologii i Nabytych Niedoborów Odporności
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu*

ul. Szwajcarska 3, 61-285 Poznań

tel.: 61 873 93 76, fax: 61 877 36 87

email: alek.witkowska@gmail.com