

# Molekulární biotechnologie č.15

Využití poznatků molekulární biotechnologie. Genová terapie

# Genová terapie - vymezení

- Cílem genové terapie u člověka:
- oprava poruch genetické informace,
- které jsou příčinou geneticky podmíněných (tj. dědičných nebo nádorových) chorob.

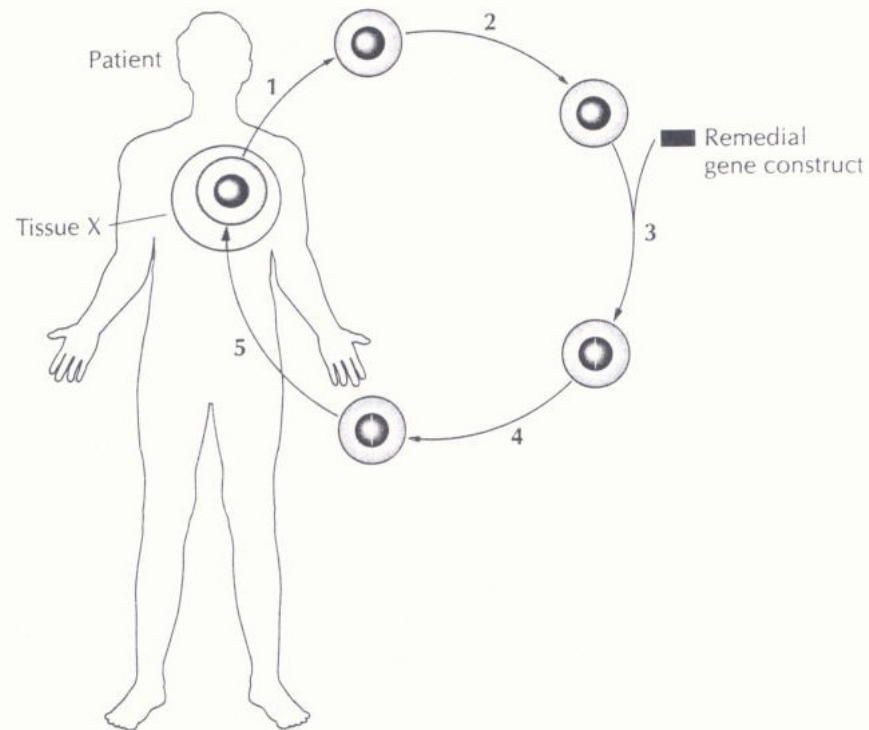
## V závislosti na charakteru onemocnění

- se genová terapie provádí:
- vnášením normálních (funkčních) genů do chorobou postižených somatických buněk nebo
- vnášením genových konstruktů,
- jejichž exprese vede v postižených buňkách k potlačení projevu poruchy genetické informace.
- U člověka se z etických důvodů provádí vnášení genů jen do somatických buněk
- nedochází ke genetickému přenosu vnesených genů na potomstvo.

## Genová terapie *ex vivo*

- Vnášení genů do cílových buněk se provádí mimo tělo pacienta.
- Cílové buňky se vyjmou z těla pacienta,
- Upraví se *in vitro* a ve funkční formě
- se opět přenesou do těla.

# *Ex vivo* genová terapie



**Figure 17.1** Schematic representation of ex vivo gene therapy. The steps in the procedure include (1) isolating cells with the gene defect from a patient; (2) growing the isolated cells in culture; (3) transfecting the isolated cells with a remedial gene construct; (4) selecting, growing, and testing the transfected cells; (5) either transplanting or transfusing the transfected cells back into the patient.

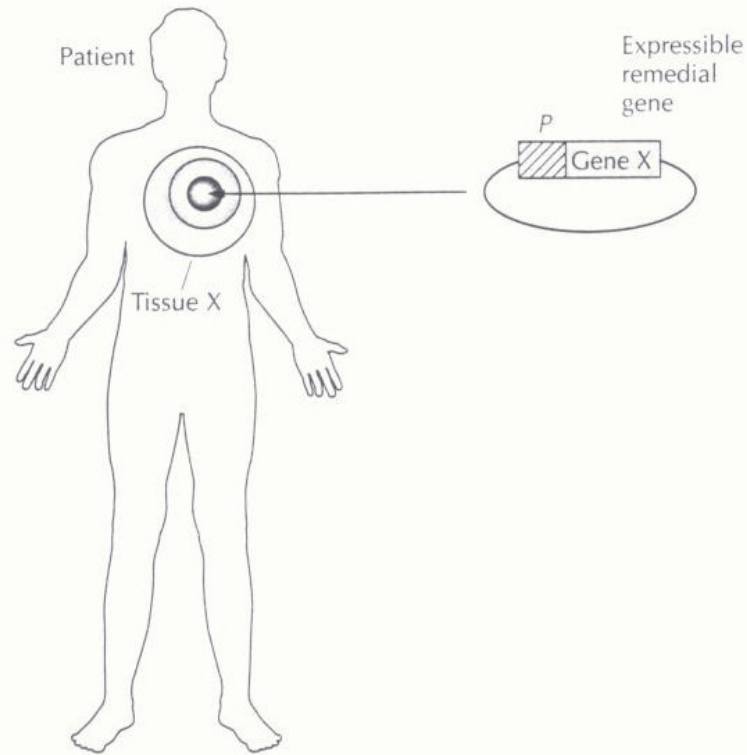
# Genová terapie *in vitro*

- Rozlišují se 2 možnosti:
- 1. Normální gen se integruje do libovolného místa genomu hostitelské buňky jako doplněk defektního genu. Normální gen kóduje funkční produkt, který nahradí produkt defektního genu.
- 2. Funkční geny lze do genomu hostitelských buněk vnést tak, že se zamění za geny poškozené mutací.
- Tento způsob provedení genové terapie dovoluje nejenom fyziologickou regulaci vnesených genů, ale také opravu dominantních defektních genů.

# Genová terapie *in vivo*

- Jako cílové buňky pro vnesení genů slouží přímo buňky v těle pacienta.
- Tento způsob vyžaduje použití vektorového systému
- přísně specifického pro cílový orgán,
- aby se zcela vyloučil zásah do zárodečných buněk.

# *In vivo* genová terapie



**Figure 17.6** Schematic representation of *in vivo* gene therapy. A cloned, expressible remedial gene is delivered to cells of a tissue of a patient with a genetic disease. The promoter ( $p$ ) is tissue specific, and the remedial gene (Gene X) encodes a protein that corrects the genetic defect of the patient.



# Výhodou při genové terapii je skutečnost

- Že se přenos genu uskutečňuje do vlastních buněk pacienta
- a imunologických komplikací se není třeba obávat.

## Substituční terapie

- Je charakteristická tím, že se buď
- genový produkt (např. peptidový hormon) zavede do organismu zvnějška nebo se
- buňky, které tento produkt syntetizují, přenesou do pacienta z vhodného dárce (transplantace kostní dřeně).
- Podává-li se genový produkt zvnějška, musí být podáván opakovaně po celý život pacienta.
- V případě transplantace tkáně hrozí příjemci komplikace v možné imunologické nesnášenlivosti s dárcovskou tkání.

# Genetické choroby léčitelné transplantací kostní dřeně

ADA-deficient severe combined immunodeficiency  
Adrenoleukodystrophy  
Chédiak-Higachi syndrome  
Chronic granulomatous disease  
Fanconi anemia  
Gaucher disease  
gpL-115 deficiency  
Granulocyte actin deficiency  
Hunter disease  
Hurler syndrome  
Infantile agranulocytosis  
Maroteaux-Lamy syndrome

Metachromatic leukodystrophy  
Non-ADA-deficient severe combined immunodeficiency  
Osteopetrosis  
Purine nucleotide phosphorylase deficiency  
Reticular dysgenesis  
Sanfilippo syndrome  
Sickle-cell disease  
Thalassemia  
Wiskott-Aldrich syndrome  
X-linked agammaglobulinemia

*Figure 17.5* Genetic diseases that can be treated by bone marrow transplantation.

# Základním předpokladem pro úspěšnou léčbu jakékoliv genetické choroby

- Je znalost její molekulární a biologické podstaty,
- která umožňuje objasnit souvislosti mezi poškozením určitého genu a fenotypovým projevem choroby.
- Gen musí být identifikován a jeho funkce podrobně charakterizována.

## Dále musí být prokázáno

- že po zavedení funkční formy genu do poškozených buněk:
- povede k odstranění nebo
- zmírnění projevů choroby a
- nebude mít negativní dopad na životně důležité funkce organismu.

# Genová terapie je proveditelná

- pouze u nemocí, které jsou založeny na defektech v 1 genu (monogenní defekty).
- Většina genetických poruch má komplexní charakter a jejich biochemický základ není zatím podrobně znám.

## Některé nemoci založené na monogenních defektech

Nemoc	Symptomy	Produkt defektního genu	Četnost
Deficience adenosindeaminázy (ADA), SCID (těžká imunodeficience)	Defektní T-lymfocyty, porucha v tvorbě protilátek, definitivní selhání imunitního systému	adenosindeamináza	1/10 000 000
Fenylketonurie	Fyzická a psychická retardace	fenylalaninhydrogenáza	1/12 000
Hemofilie A + B	Porucha v srážlivosti krve, krvácivost	Faktor VIII, faktor IX	1/1 000 000 mužů
Familiální hypercholesterolemie	Předčasné arteriosklerotické změny cév	LDL-receptor	1/500
Deficience na alfa1-antitrypsin	Plicní emfyzém (rozedma plic)	Alfa1-antitrypsin	1/3 500
Cystická fibróza, CF	Porucha v transportu Na, zahlnění dýchacích cest, embolie	transmembránový regulátor CF	1/2 500
Gauscherova choroba	Nádory sleziny, zvětšení jater, pigmentace kůže	glukocerebrozidáza	
Duchennova svalová dystrofie	Svalová ochablost	dystrofin	1/3 000 mužů
Leschův-Nyhanův syndrom	Usazování kys. močové v kloubech a ledvinách poruchy CNS	hypoxantinguaninfosforibosyltransferáza	1/1 000 000

# Četnost výskytu chorob s monogenními defekty

**Table 17.1** Current therapies for 10 single-gene human disorders.

Gene product	Disease/Symptoms	Frequency	Current therapy	Prognosis
Adenosine deaminase	Severe combined immunodeficiency Loss of T and B cells	1:1,000,000	Bone marrow transplant; adenosine deaminase replacement	Without therapy: fatal by 2 years. With therapy: clinical improvement
LDL receptor	Familial hypercholesterolemia Elevated blood serum cholesterol, coronary artery disease	1:500 (Heterozygotes)	Diet, drugs, liver transplant	Some clinical improvement
Glucocerebrosidase	Gaucher disease Accumulation of glucocerebrosidase in macrophages causing liver, spleen, and bone damage	1:2,500 (Jewish populations); rare in non-Jewish populations	Symptomatic treatment: removal of spleen, antibiotics, repairing bone damage, bone marrow transplant, enzyme replacement	Some clinical improvement
Blood clotting factor VIII	Hemophilia A Altered plasma protein that causes defective blood clotting, chronic internal bleeding into joints, excessive bleeding after wounding	1:10,000 (Males)	Concentrates of factor VIII by transfusion	Extended life expectancy, requires continual treatment, risk of viral infection from transfusions
Phenylalanine hydroxylase	Phenylketonuria Excess phenylalanine in the bloodstream of newborns causes mental retardation	1:10,000	Restriction of dietary phenylalanine	Good in many cases, if treatment is started early and maintained
$\alpha_1$ -Antitrypsin	Emphysema Deficiency of serum protein protease inhibitor, damage to the lungs, cirrhosis of the liver	1:3,500	Replacement therapy, lowering environmental risks	Progression of the disease is slowed but not stopped



# Četnost výskytu chorob s monogenními defekty

*Table 17.1 (continued)*

Gene product	Disease/Symptoms	Frequency	Current therapy	Prognosis
Cystic fibrosis transmembrane regulator	Cystic fibrosis Multisystem disease, pancreatic insufficiency in some cases, intestinal blockage, blocked airways of the lungs	1:2,500 (Caucasians)	Antibiotics, physical clearing of the lungs, upgrading diet	Fatal by late 20s
Ornithine transcarbamylase	Hyperammonemia Urea cycle defect, ammonia accumulates, arginine deficiency.  <i>Early form:</i> within 72 h of birth, lethargy, vomiting, coma, death, and, if survival, irreversible brain damage.  <i>Late form:</i> vomiting, lethargy, seizures	1:40,000	Restricted protein diet, arginine-supplemented diet, drugs, liver transplant	Late form: good Early (severe) form: symptoms diminished
Dystrophin	Duchenne muscular dystrophy Progressive muscle wasting	1:7,500 (Males)	Only supportive treatments: good nutrition, aid in respiratory function, confinement to a wheel chair	Fatal by early 20s
$\beta$ -Globin	Sickle-cell disease Chronic anemia, multisystem disease, damage to spleen, heart, kidney, liver, and brain; heterozygotes have a mild form of the disease	1:500 (Heterozygotes in populations of Black African origin; less frequent in other populations)	Blood transfusions, drugs, analgesics, bone marrow transplant	Symptoms diminished; treatments suboptimal

# Onemocnění dnes léčitelné genovou terapií somatických buněk

Acute myeloid leukemia  
AIDS  
Atherosclerosis  
Breast cancer  
Cardiovascular disease  
Colon cancer  
Cystic fibrosis  
Emphysema

Fabry disease  
Gaucher disease  
Hemophilia A  
Hemophilia B  
Hypercholesterolemia  
Leukemia  
Liver cancer  
Lung cancer

Macular degeneration  
Malignant melanoma  
Neuroblastoma  
Osteoporosis  
Parkinson disease  
Renal cell carcinoma  
SCID  
Sickle-cell anemia

*Figure 17.8* Diseases that are currently being considered for treatment with somatic cell gene therapies.

# Genová terapie nádorů

- Je zaměřena na nádorový nekrotický faktor alfa (TNF-alfa) (protein cytokin přirozeně produkováný T-lymfocyty) (intravenózní aplikace u myší vede k úbytku nádorů).
- Gen kódující TNF-alfa byl přenesen do populace T-lymfocytů infiltrujících do nádorů (TIL).
- Jako vektor byl použit retrovirus, TIL byly izolovány z chirurgicky vyňatého nádoru.
- Slabá regrese nádoru byla detekována.

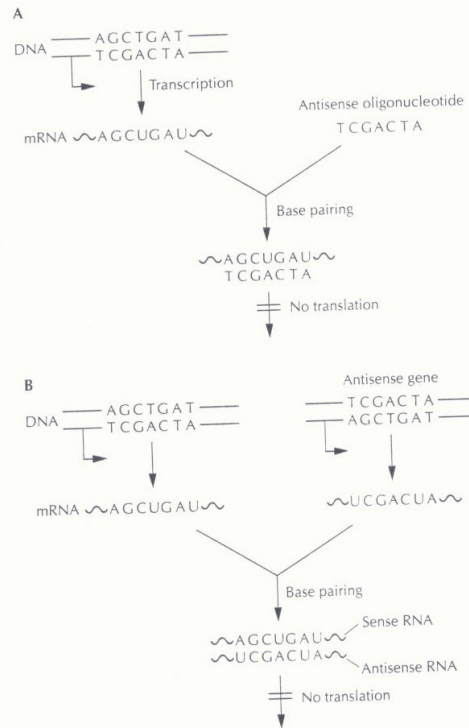
# Cílené přímé a nepřímé usmrcení nádorových buněk

- Používá se k léčení nádorů
- Geny jsou zavedeny do cílových buněk tak, aby jejich exprese vedla k usmrcení buňky
- Přímé působení: Transgen kóduje letální toxin nebo produkt, který je citlivý na následně podaný lék, což vede k smrtícímu účinku.
- Nepřímé působení: Do cílových buněk se zavedou imunostimulační geny, které stimulují imunitní odpověď proti cílovým buňkám.

# Cílená inhibice genové exprese *in vivo* - různé způsoby zastavení exprese genu na úrovni DNA, RNA nebo proteinů:

- 1. Mutace cílená na inaktivaci genu do nefunkční formy
- 2. Zastavení replikace genu vazbou specifického oligonukleotidu TFO tvořícího s dsDNA triplex (problémy jsou s vytvořením stabilního triplexu *in vivo*)
- 3. Zastavení exprese genu na úrovni translace vazbou protismyslného oligonukleotidu nebo specifické protismyslné RNA na mRNA cílového genu. Protismyslné oligonukleotidy se připravují chemicky. Protismyslná RNA se připravuje transkripcí pozitivního řetězce klonovaného protismyslného minigenu, který je obrácenou formou genu získaného jako cDNA původního genu.
- 4. Zastavení exprese genu na úrovni translace ribozymem, který štěpí mRNA cílového genu. Ribozym se připraví transkripcí pozitivního řetězce vhodného minigenu, takže působí jako protismyslná RNA a navozuje katalyticky štěpení mRNA, na kterou se v buňce navázal.
- 5. Použití intracelulárních protilátek a oligonukleotidových aptamerů. Intracelulární protilátky jsou cíleny na vazbu specifických proteinů v buňce. Aptamery jsou oligonukleotidy vyznačující se sekvencí, která umožňuje jejich vazbu ke specifickým proteinům a tím zablokování jejich funkce.

# Dvě strategie antisens terapie



**Figure 17.7** Two strategies using antisense therapy for inhibition of specific mRNAs. The right-angled, rightward pointing arrows show the direction of transcription from the lower DNA strand of the DNA duplexes of a chromosome. **A.** Antisense oligonucleotide strategy: An oligonucleotide that has an antisense sequence to a region of a target mRNA is introduced into a cell; by base pairing to the target mRNA, it prevents the translation of this mRNA. **B.** Antisense gene strategy: An expressible gene that is cloned in its reverse orientation is introduced into a cell. The RNA that is transcribed from this construct is the antisense sequence of the normal mRNA. When the antisense RNA base pairs with the mRNA, translation of the mRNA is prevented. The antisense RNA does not contain signals for the initiation of translation.

# Perspektivy genové terapie

- Z 2/3 zaměřeny na léčbu rakoviny
- Zbývající na monogenně podmíněné dědičné choroby nebo prevence infekčních chorob (AIDS).
- Genová terapie vychází z teoreticky odůvodněných a experimentálně ověřených předpokladů
- Úkoly: Výběr dalších vhodných cílových molekul, zlepšení způsobů dopravování terapeutických molekul do cílových míst a optimalizace jejich efektorových funkcí.