

# **Genové technologie**

## **Genová terapie**

# Genová terapie

- Nejčastěji se genová terapie používá o monogenních recesivně dědičných onemocnění. Zanesení genu v jedné kopii pak vede k řešení defektu. Říkáme tomu:
  - **Náhradní genová terapie**

# Genová terapie

- Ideální dochází k expresi postiženého genu pouze v některých orgánech, takže stačí zanést gen do postižených orgánů a ne do celého těla.

# Genová terapie

- Základními kroky genové terapie jsou:
  - Identifikace a charakterizace genu
  - Klonování genu
  - Výběr vektoru pro přenos genu
  - Metoda přenosu
  - Exprese genu

# Genová terapie

- Kopie nemutovaného genu je do těla pacienta vnesena injekčně do krevního oběhu nebo do tkáně, může být také připraven aerosol pro přenos do nosní sliznice nebo plic. Někdy jsou buňky z pacienta odebrány, geneticky upraveny a vráceny zpět do těla – tomu říkáme **genová terapie ex vivo**.

# Genová terapie

- Nejčastěji se pro přenos genu používá modifikovaný živočišný virus – 70% experimentů s genovou terapií člověka využívá virové vektory pro přenos genu. Tyto používané viry se pak dělí na retroviry a adenoviry.

# Genová terapie

- V malém procentu případů se používá přímo DNA nebo se DNA vpravuje do pacienta v liposomech.

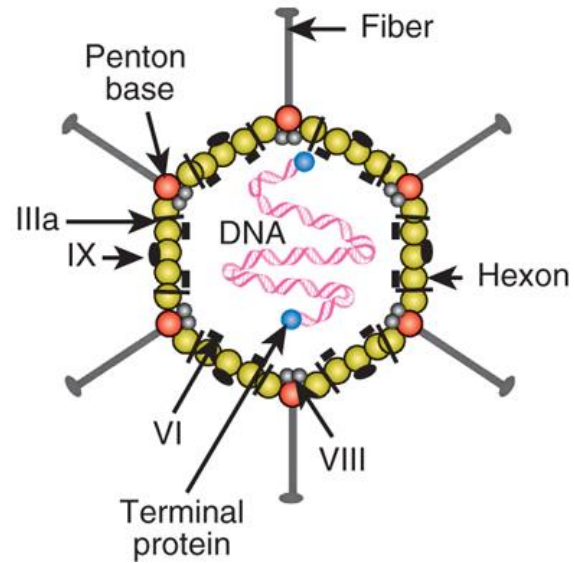
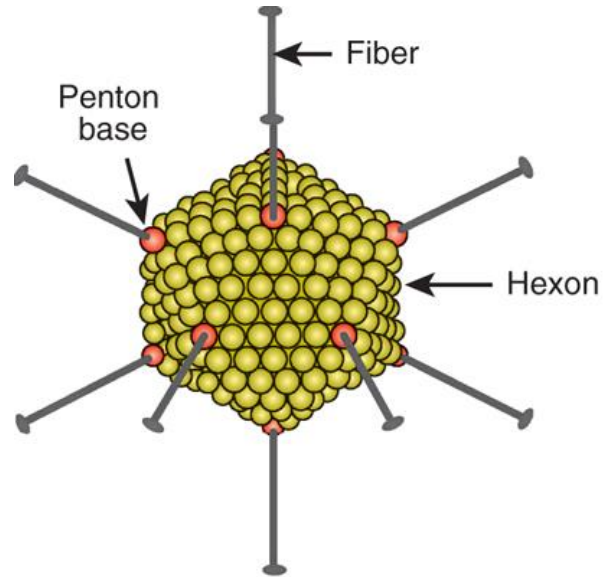
# Adenovirové vektory v genové terapii

- Adenoviry jsou DNA viry s dvojšroubovicovou strukturou DNA
- Mají ikosahedrální kapsidu tvořenou 240 hexony
- Uvnitř viru je jedno lineární vlákno DNA o délce asi 36000bp
- Rozlišujeme asi 50 různých serotypů



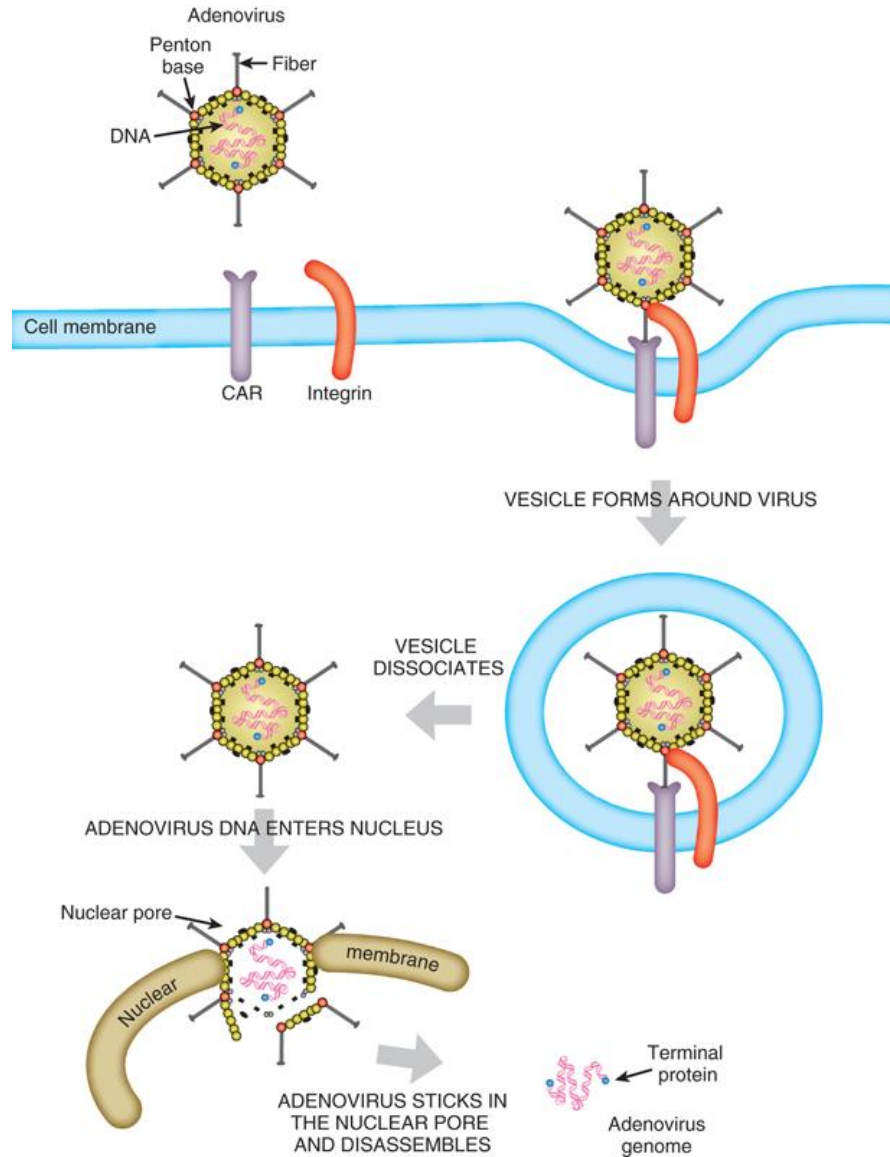
# Adenovirové vektory v genové terapii

- Pět stran virové kapsidy se sbíhá do bodu, kde se nachází penton, který se skládá z pentamerové báze a výběžku z trimeru. Výběžek se délkou liší mezi různými skupinami adenovirů a jeho hrot se váže na receptory na povrchu hostitelské buňky.
- Receptory nazýváme CAR (coxsackievirus adenovirový receptor)



# Adenovirové vektory v genové terapii

- Receptory CAR se nacházejí v mnoha živočišných tkáních. Poté co se konec pentonového výběžku naváže na receptor, samotný penton se naváže na integriny hostitelské buňky. Integriny jsou transmembránové proteiny na živočišných buňkách a slouží k adhezi. Poté cytoplasmatická membrána se vchlípí a vytvoří váček.

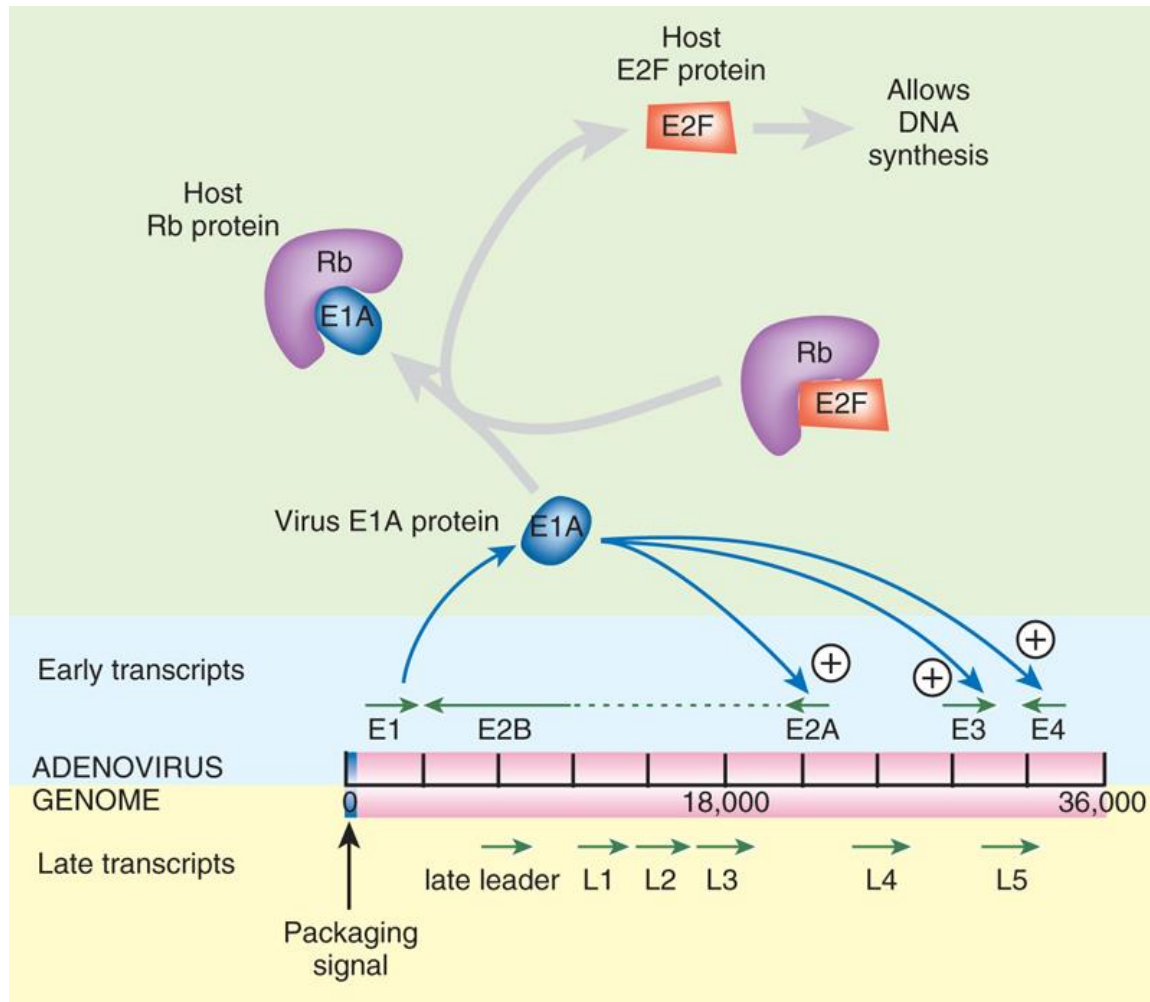


# Adenovirové vektory v genové terapii

- Váček je poté přenesen do cytosolu a prostřednictvím cytoskeletu putuje k jádru buňky. Před vstupem do jádra je virion rozložen a do jádra vstupuje pouze DNA.
- Adenoviry mohou způsobovat závažná zánětlivá onemocnění. Proto jsou před genovou terapií zbavena schopnosti se pomnožovat v hostitelských buňkách.

# Adenovirové vektory v genové terapii

- Delecí genu pro E1A protein dochází k této úpravě adenoviru. Tento protein spouští transkripci tzv. časných virových genů a váže se zároveň na Rb protein hostitelské buňky, čímž odblokuje jeho preventivní působení před vstupem buňky do S fáze.



# Adenovirové vektory v genové terapii

- Takto upravený virus je produkován v laboratoři na buňkách, které ve svém genomu obsahují E1A gen. Takto vytvořený virus se nemůže v hostitelských buňkách při genové terapii replikovat.



# Adenovirové vektory v genové terapii

- Pokud do viru vkládáme nový gen, nesmí být celková délka DNA adenoviru delší ani kratší než o 5%, jinak se neposkládá do kapsidy. To omezuje použití tohoto vektoru na krátké geny.

# Adenovirové vektory v genové terapii

- Problémem adenovirových genových terapií je, že exprese vydrží pouze několik týdnů, dokud imunitní systém nezlikviduje buňky. Pacient si vytváří imunitní odpověď na daný adenovirus a ten nemůže být použit 2x. Nejedná se tedy o dlouhodobou genovou terapii dědičných onemocnění. Používá se spíše na genovou terapii nádorů.

# Cystická fibróza

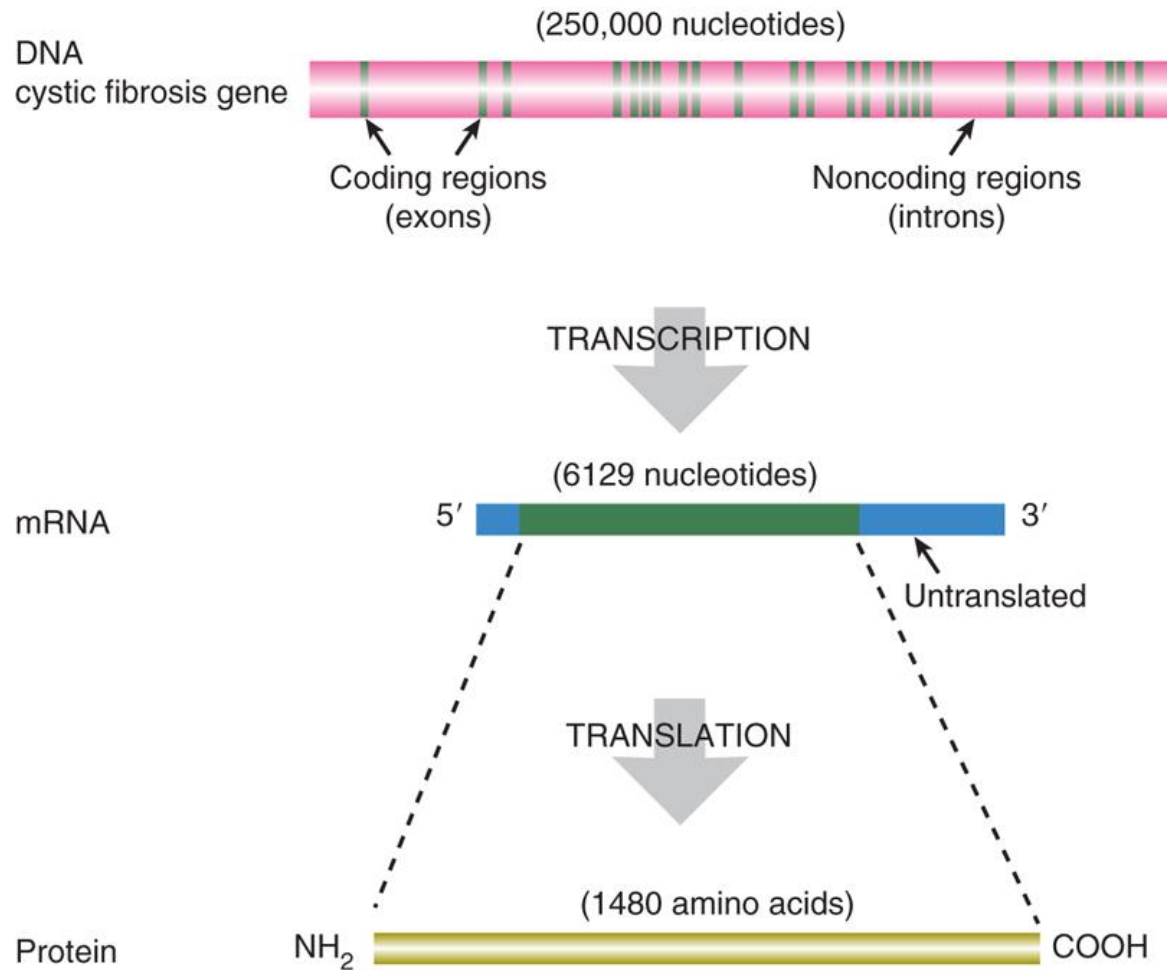
- Cystická fibróza je nejčastější genetické onemocnění i v české populaci. Přibližně jedno ze dvou tisíc dětí bělošské populace je nositelem homozygotní varianty recesivní mutace.
- Gen kóduje takzvaný CFTR protein, který se nachází buněčných membránách jako chloridový kanál.

# Cystická fibróza

- U pacientů s cystickou fibrózou je chloridový kanál defektní a ovlivňuje mnoho tkání, především plicní tkáň. Vede to k nedostatku vody na sliznicích, což vede k častým infekcím způsobeným patogenními mikroorganismy. Buňky plicní tkáně jsou pak postupně nahrazovány nefunkční vazivovou tkání – vzniká fibróza.

# Cystická fibróza

- Gen CFTR je dlouhý 250 tisíc bazí a obsahuje 24 exonů, které kódují protein o 1480 aminokyselinách. Pouze 2% celého genu je kódující DNA, zbytek jsou intronové sekvence. Např. v USA se nachází v 70% mutace delta 508 (delece 3 bazí pro fenylalanin), v Holandsku způsobuje 90% onemocnění, na Blízkém východu pouze 30% onemocnění.



# Cystická fibróza

- Onemocnění může být způsobeno až 500 různými mutacemi tohoto genu, takže genetický skríning není jednoduchý.

# Cystická fibróza

- K rozšíření mutace došlo zřejmě v Evropě před přibližně 2000 lety v souvislosti s epidemiemi tyfu a moru, kdy mutace bránila dehydrataci při úporných průjmech.

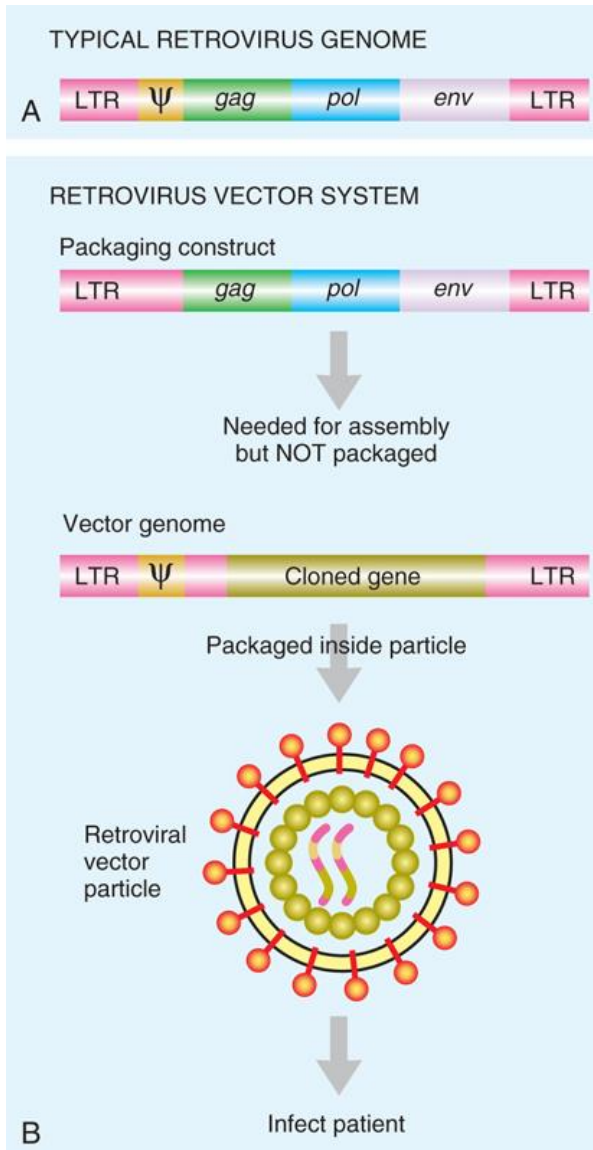


# Cystická fibróza – genová terapie

- Plíce jsou přístupné genové terapii formou aerosolu. Adenovirová terapie s nemutantním CFTR genem byla úspěšná, ale jen 30 dnů, dokud nedošlo k zastavení exprese. V současnosti lze použít pro pacienty s mutací G551D Ivacaftor (Kalydeco), kdy roční léčba se blíží milionu Kč.

# Retrovirová genová terapie

- Využívá se retrovirů. Před vložením genu do retroviru musí být odstraněny introny.
- Základní genom retrovirů se skládá ze tří genů – gag, pol a env.
- Z vektorů pro genovou terapii se používá například myší leukemický virus (MuLV). Vektor má geny odstraněny, takže nedochází k jeho replikaci.



# Retrovirová genová terapie

- Vzhledem k tomu, že jsou odstraněny geny retrovirových genomů, nevznikají na retrovirové vektory imunitní reakce ani zánětlivé reakce. Retrovirové vektory začleňují geny do hostitelské DNA. Retrovirové vektory mohou nést jen malé geny (max 8 kb) a nemohou infikovat nedělicí se buňky

# Adeno-asociovaná genová terapie

- Genová terapie pomocí adenovirů a retrovirů má svá omezení a z tohoto hlediska se jeví jako slibné adeno-asociované viry (AAV). AAV jsou defektní samy o sobě a lze je nazvat satelitními – je třeba, aby buňka byla napadena adenoviry a pak teprve AAV mají nějakou funkci.

# Adeno-asociovaná genová terapie

- Přednostmi AAV jsou:
  - Nestimulují imunitní odpověď hostitele
  - Mohou být použity opakovaně
  - Mohou být kultivovány na mnoha typech buněk
  - Napadají i nedělicí se buňky

# Adeno-asociovaná genová terapie

- Přednostmi AAV jsou:
  - Integrují se pouze do jednoho místa v genomové DNA
  - Různé serotypy mohou napadat různé typy tkání

# Adeno-asociovaná genová terapie

- Genom AAV je malý – 4681 nukleotidů
- Virus obsahuje ssDNA, polovina virových částic pak obsahuje + a polovina – vlákno.
- Při absenci helprového viru se AAV jen integruje do hostitelského genomu a nic nedělá – zůstává latentní.
- Funkci helprového viru dělá samotný druhý konstrukt AAV.



# Adeno-asociovaná genová terapie

- Tato genová terapie se zkoumá pro léčbu hemofilie B, muskulární dystrofie, věkem podmíněné makulární degeneraci, Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby atd.

# Nevirová genová terapie

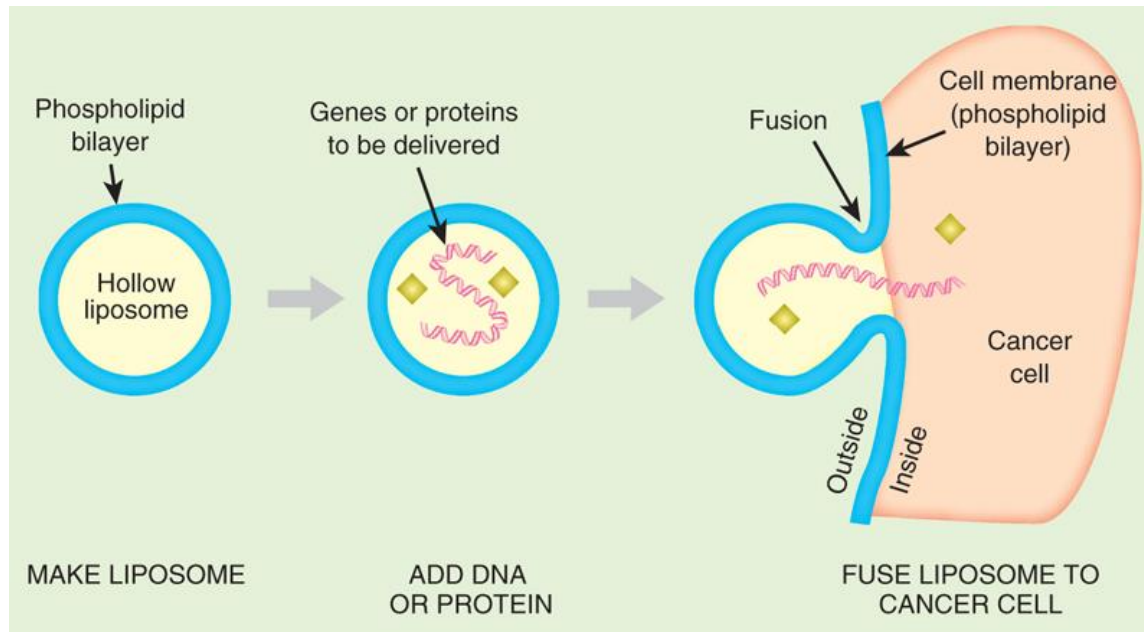
- Nahá DNA nebo RNA
- Nukleové kyseliny uzavřené ve fosfolipidových váčcích
- Bombardování částicemi – DNA je vázána na kovové částice
- Receptorem řízené vychytávání – DNA vázána na protein, ten se naváže na receptor a spolu s proteinem do buňky vstoupí DNA

# Nevirová genová terapie

- Komplexy polymeru s DNA – DNA se váže na pozitivně nabitý polymer, který chrání negativně nabitou DNA. Tyto komplexy jsou pak přijímány buňkou. Toto se používá při ex- vivo genové terapii.
- Enkapsulované buňky – celé upravené buňky jsou vloženy do porézního polymerního obalu a injikovány do těla

# Liposomová genová terapie

- 10% genových terapií se provádí pomocí liposomů
- Mikroskopické váčky mohou být naplněny DNA nebo jinými molekulami
- Liposomy splývají s cytoplasmatickou membránou buněk a jejich obsah se dostává do cytosolu. Je to nespecifické.



# RNA v genové terapii

- Lze využít anti-sense RNA v potlačení genové exprese, mnohem více se uvažuje o ribozymech, RNA interferenci, miRNA a umělých aptamerech.
- Aptamery mohou být oligonukleotidy, které jsou poskládány tak, že se vážou netypicky na specifické proteiny – např. na trombin

# RNA v genové terapii

- Aptamery se používají v léčbě VPMD –  
Macugen
- RNA aptamer se váže na VEGF a brání  
abnormální vaskularizaci sítnice.

# Genová terapie umělými nukleázami

- Někdy nemusí být gen nahrazen, ale stačí jeho editace. Například lze sestavit dvě FokI restriktázy, které se nacházejí z obou stran místa, které bude štěpeno, tím dochází k lepší specifitě. Pokud se sejdou naproti sobě, vznikne dimer, který provede rozštěpení DNA a buňka má opravné mechanismy, které štěpenou DNA opraví a zároveň opraví sekvenci



