

Genová terapie

Petr Müller
Masarykův onkologický ústav

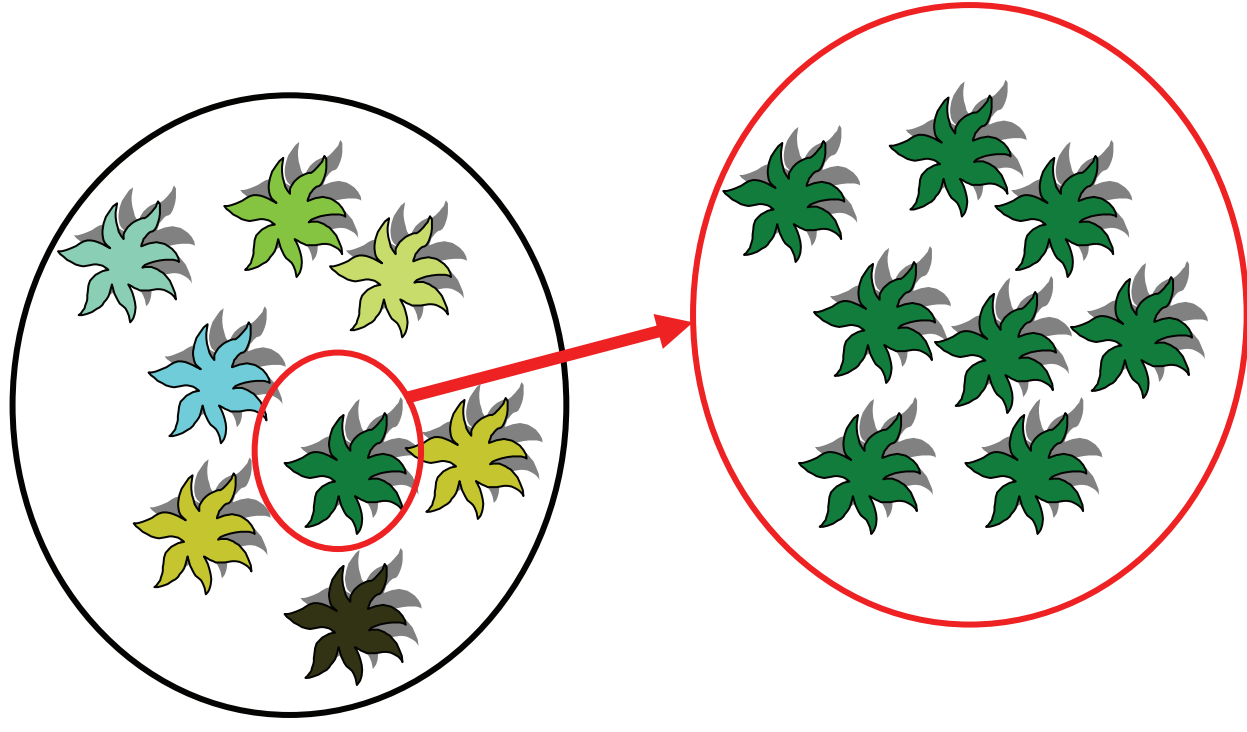
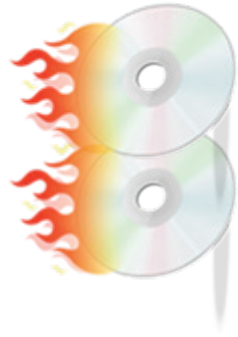
Genová terapie

=terapie využívající vpravení exogenní DNA do buněk či tkání organismu za účelem opravy fenotypu (deficience či mutace genu, vrozené či získané choroby)

- klonování
- expresní systémy
- transfekce eukaryotických buněk
- genová terapie v praxi

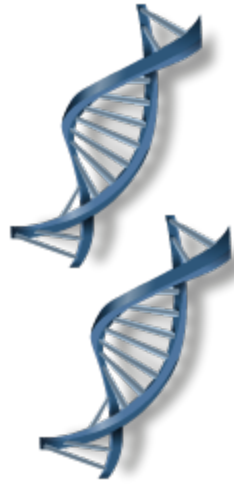
V běžné laboratoři se používá řada užitečných technik a postupů, které byli vyvinuty pro zdokonalení genové terapie

Klonování = vytváření identické kopie



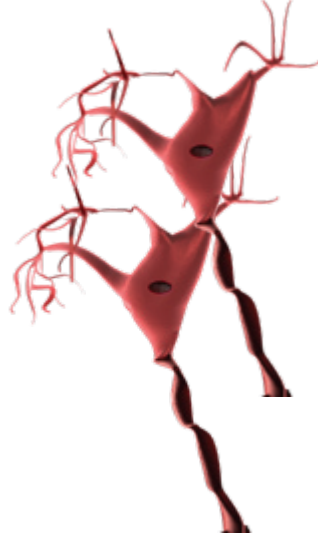
Klonování v biologii

- Klonování DNA (genů)=molecular cloning



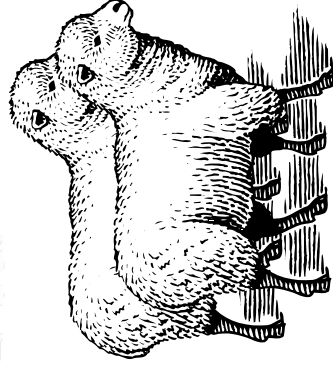
- Klonování buněk

- selekce mutantů-klonovací kroužky
- selekce hybridomů
- klonování kmenových buněk

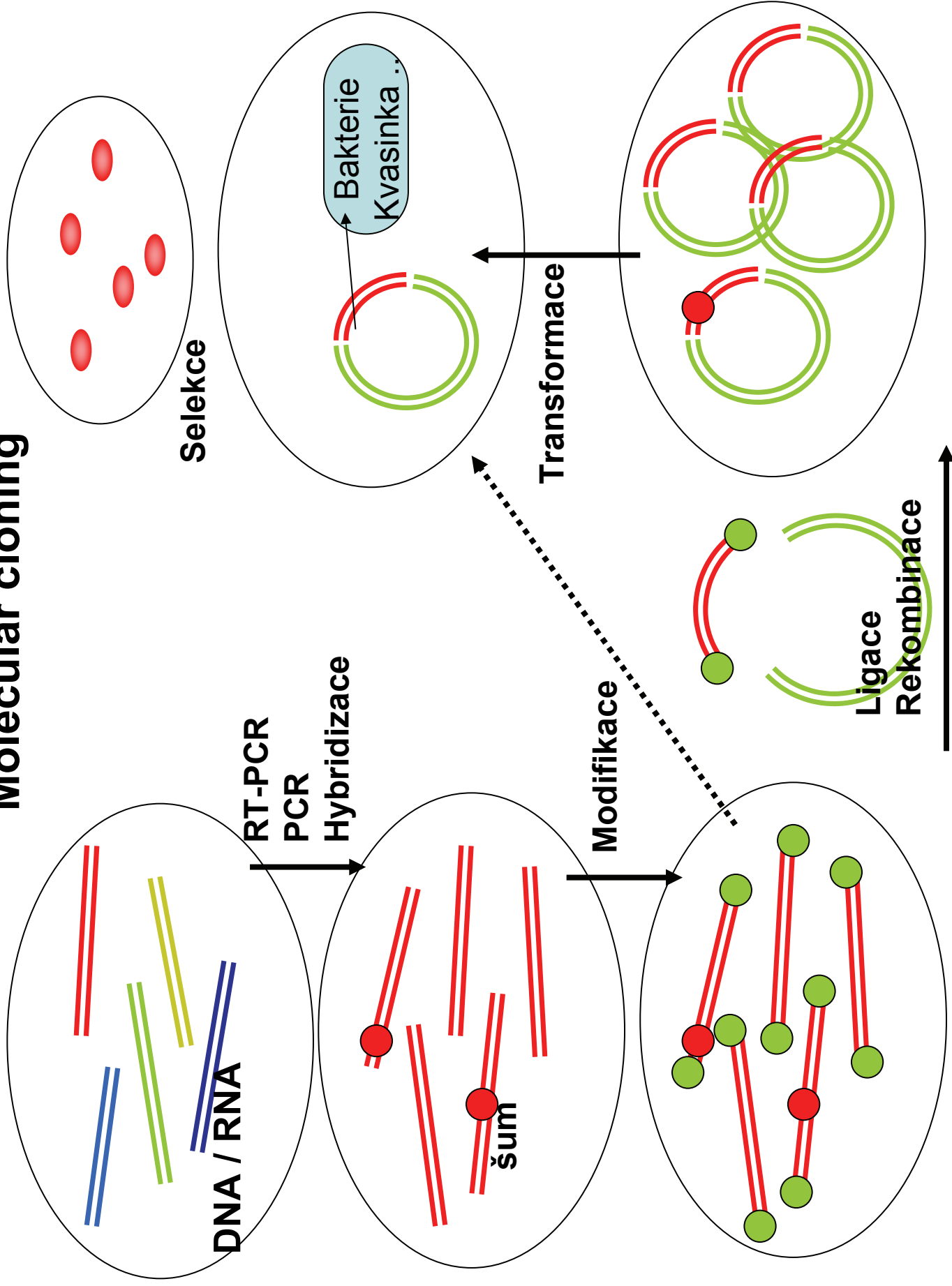


- Klonování organismů

- vegetativní rozmnožování- řízkování
- partenogeneze
- klonování zárodečných buněk
- somatické klonování



Molecular cloning



Výběr plasmidu

expresní organismus

- bakterie
- virus
- eukaryota

Selekce

bakterie: Ampicilin, Kanamycin, Spectinomycin,
Chloramphenicol, Doxycyclin, Rifampicin
eukaryota: Geneticin, Blastidicin, Zeocin, Puromycin...

Promotor

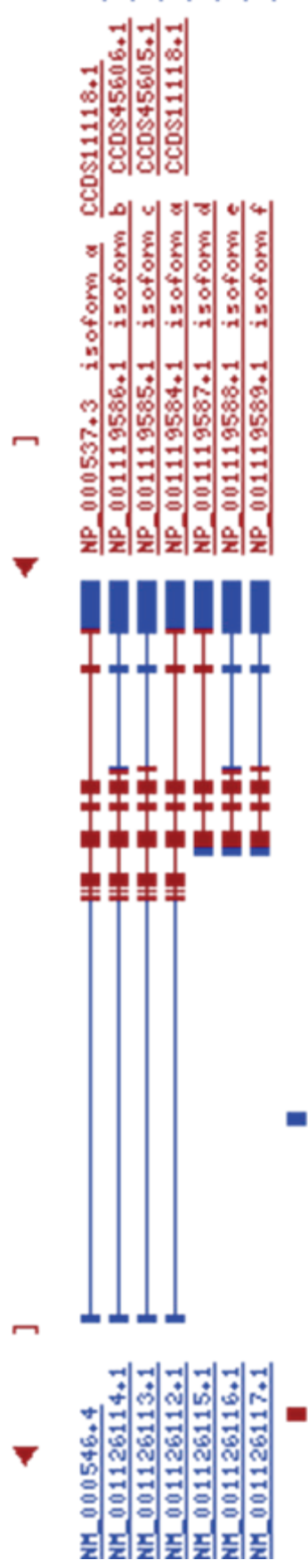
virový, inducibilní, tkáňově specifický

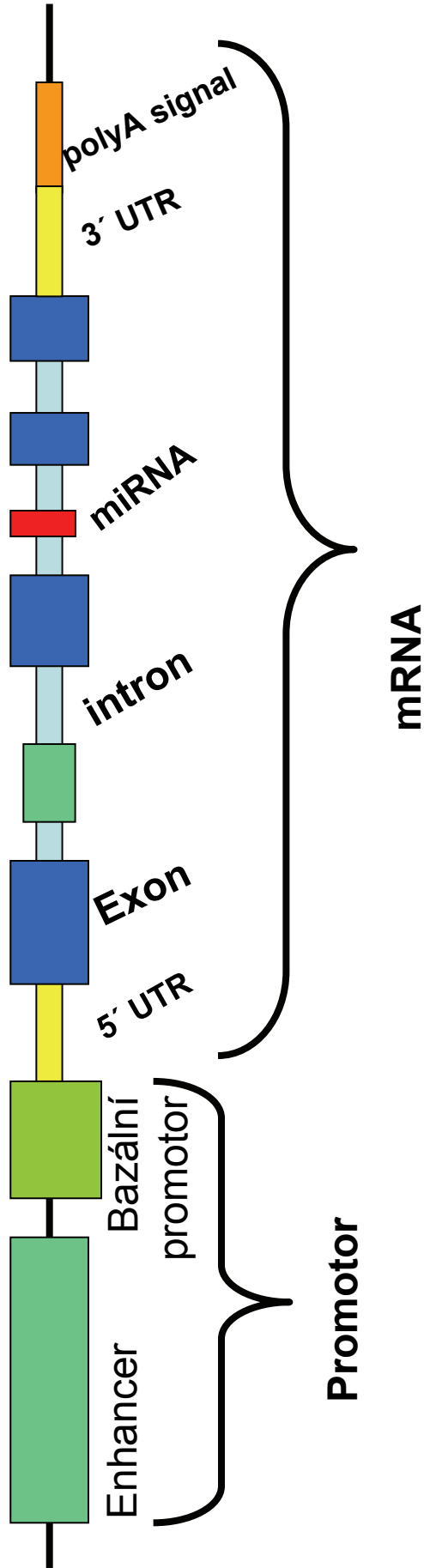
Struktura genu, mRNA

Vektory pro genovou terapii

- **DNA**
 - lineární DNA
 - plasmidová DNA
- **Viry**
 - Adenovirus
 - Adeno associated virus
 - Retroviry=MMLV, HIV=Lentivirus
 - Herpesvirus

Genová terapie ≠ náhrada původního genu

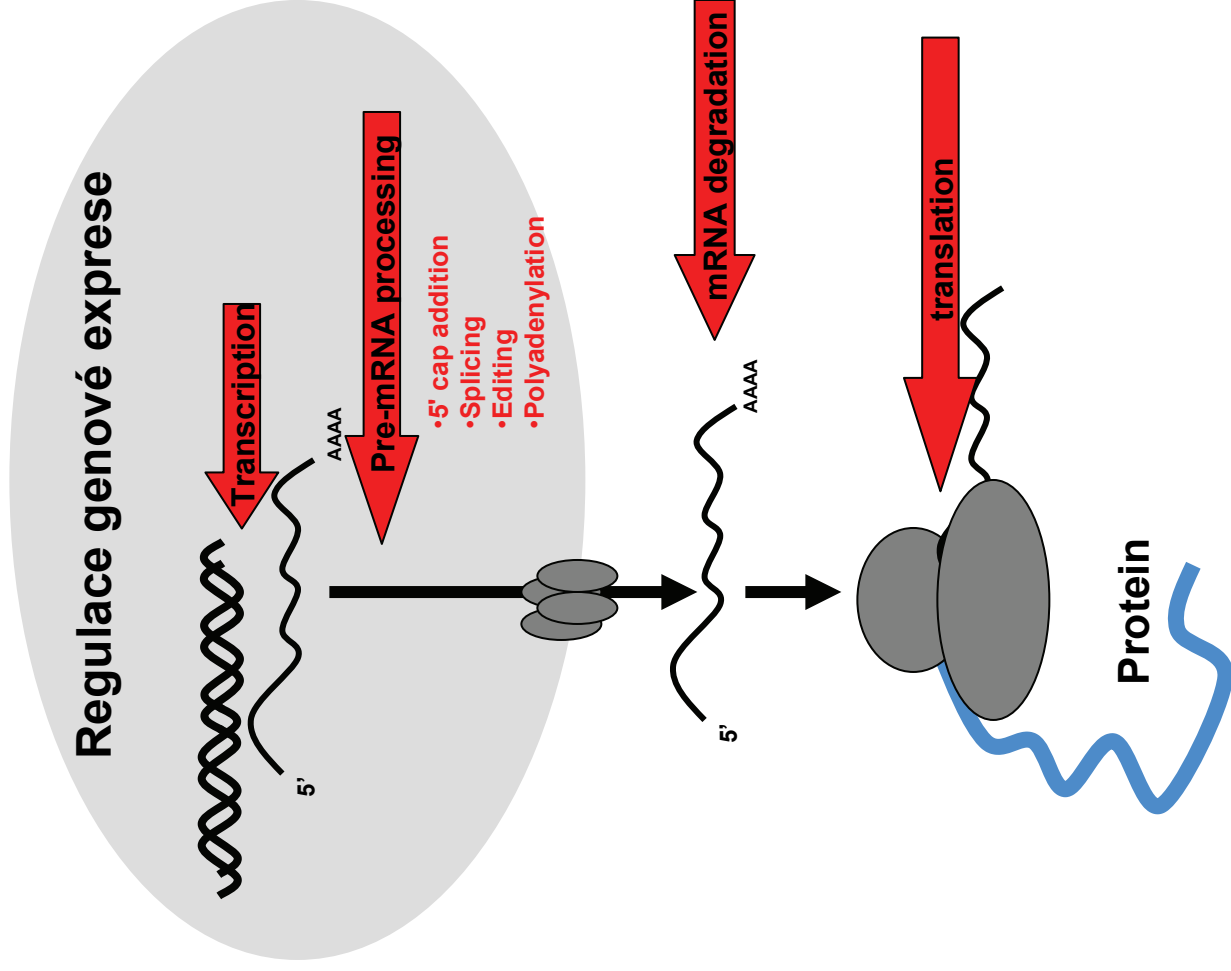




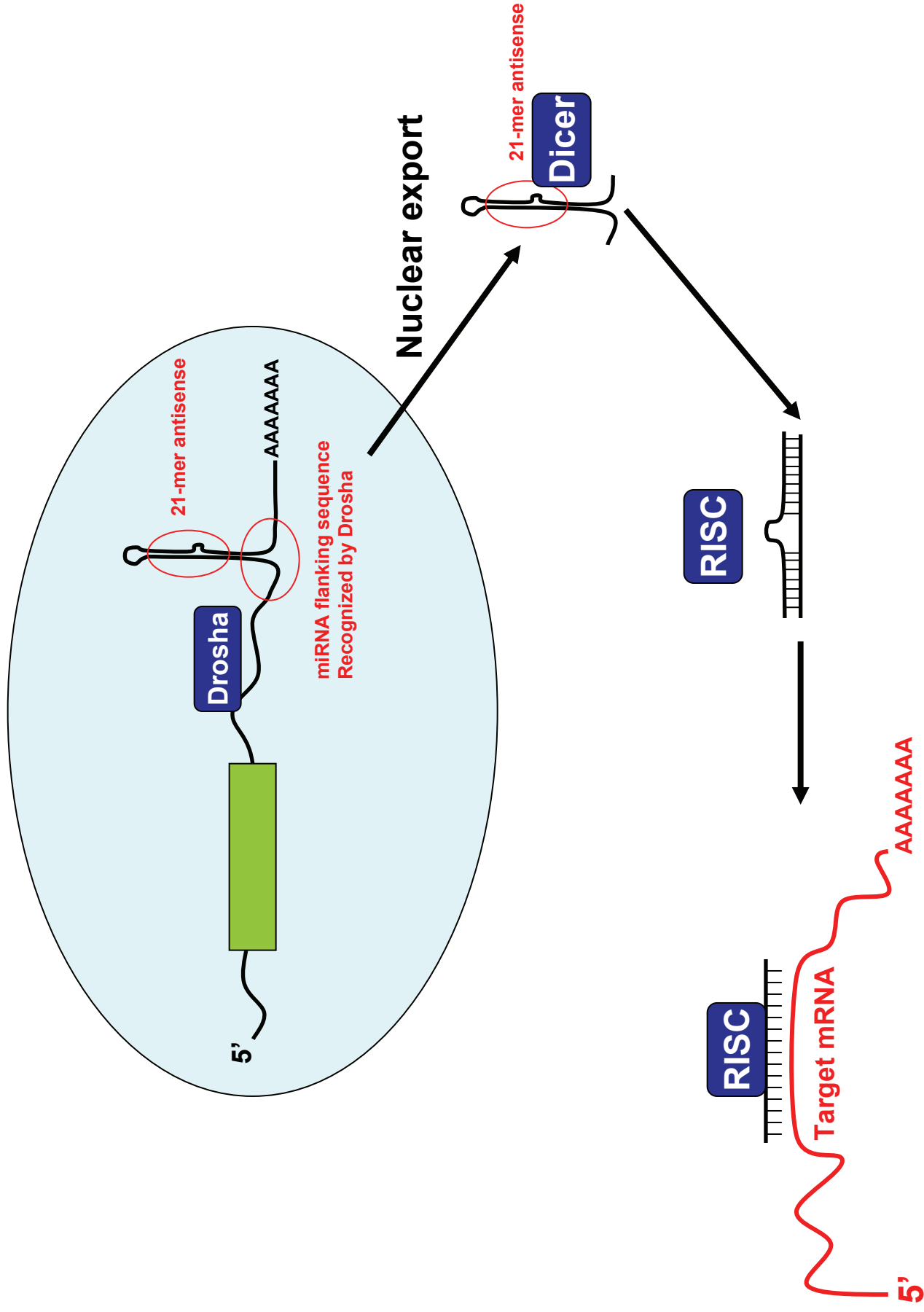
Snaha o uvedení genové terapie v praxi probíhá paralelně s výzkumem regulace genové exprese

Požadavky na dobrý vektor:

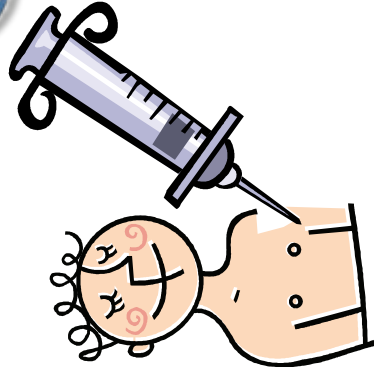
- Správné začlenění do genomu
- Dlouhodobá exprese
- Tkáňově specifická exprese
- Optimální dávka
- Export mRNA z jádra do cytoplasmy
- Poločas rozpadu mRNA
- Úspěšné zahájení translace



RNA pol II regulated micro RNAi



In vivo versus ex vivo



In vivo
vektor
vektor

+

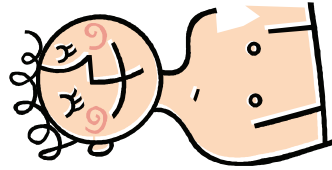
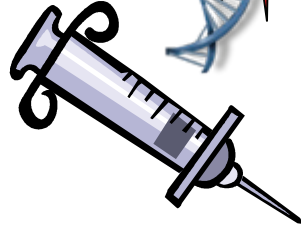
Vysoká okamžitá exprese
Distribuce ve všech tkáních

-

Imunitní odpověď
Náhodné začlenění

+

Cílená tkáň
Optimální exprese



Ex vivo
vektor
vektor
•větší

-

Omezená distribuce buněk

Choroby potenciálně léčitelné genovou terapií

Chybějící sérové proteiny

- Hemofilie-faktor VIII, IX
- Wilsonova choroba- Ceruloplasmin

Metabolické choroby

- Deficience ornitin dekarboxylázy

Svalové dystrofie

Poruchy imunitního systému

- SCID-ADA deficience, X=linked...

Další choroby s Mendelovskou dědičností

- Cystická fibróza

Nahrazení chybějícího
či mutovaného genu

Malignity

- Solidní nádory
- Leukemie, Lymfomy

Zabití buněk

Neurodegenerativní choroby

- Alzheimer- agregace Tau
- Huntingtonova choroba
- Parkinsonova choroba

Odstranění
agregovaného proteinu

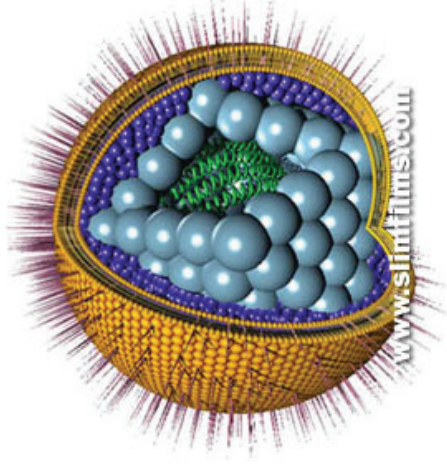
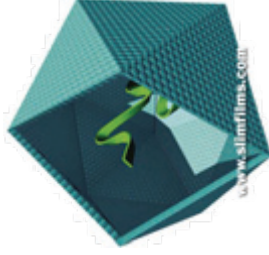
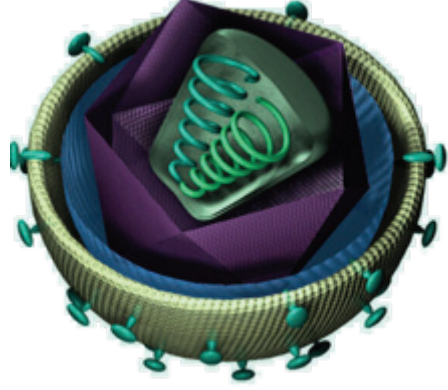
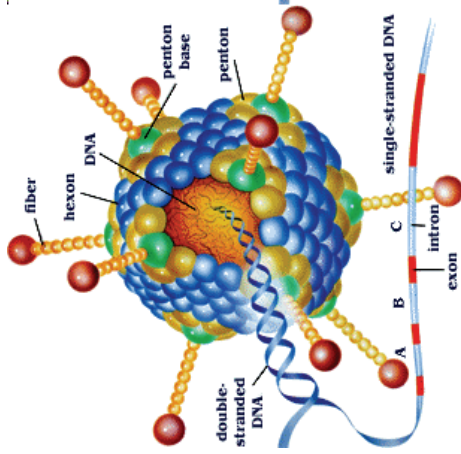
Multifaktoriální choroby

- Kardiovaskulární choroby
- Oční choroby

Kompensace poruchy,
regulace

Virové vektory:

většinou neschopné replikace (crippled)



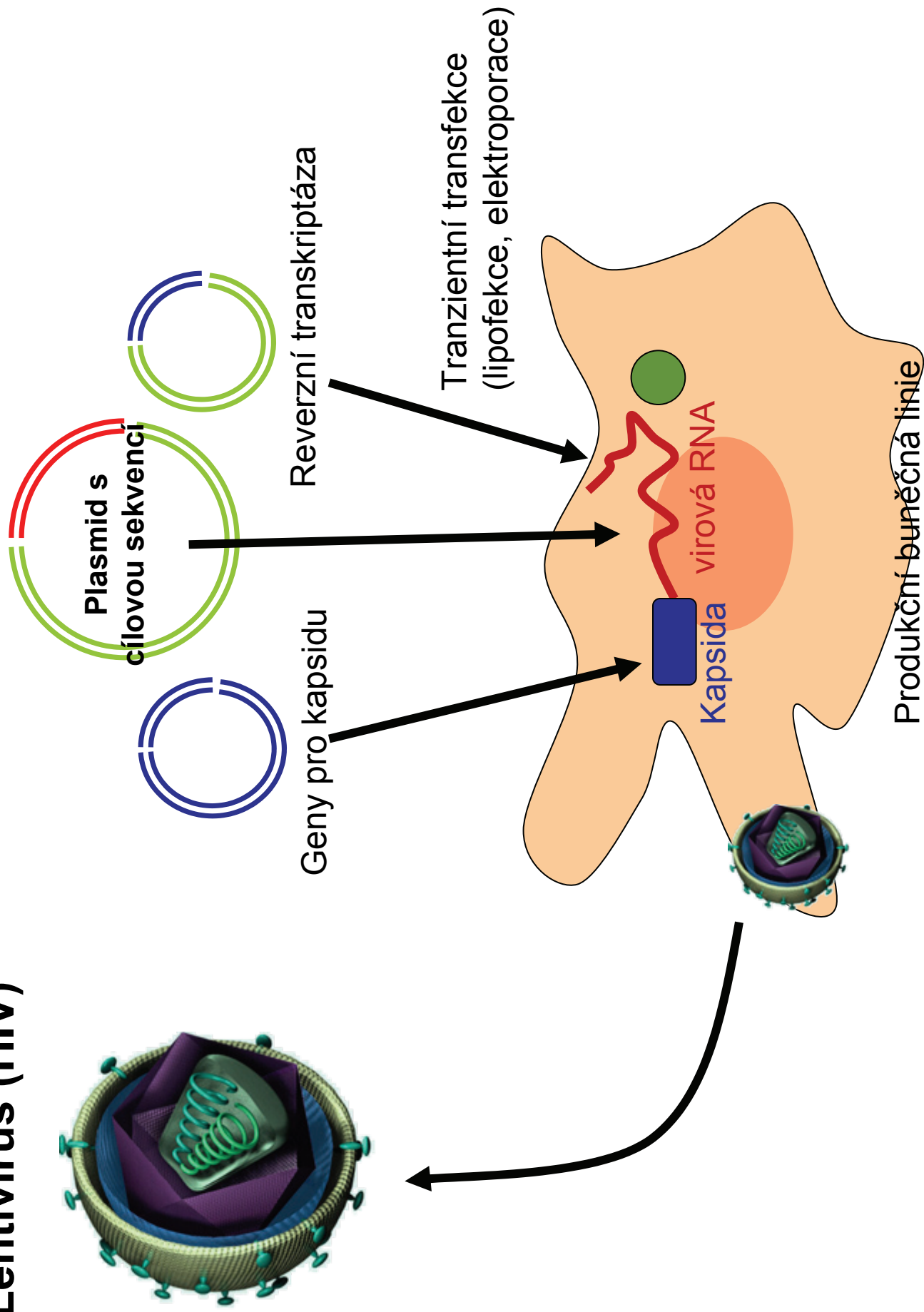
- Vysoká schopnost vniknout do buněk
- Možnost zacílení prostřednictvím povrchových receptorů
- Schopnost aktivně se začlenit do genomu



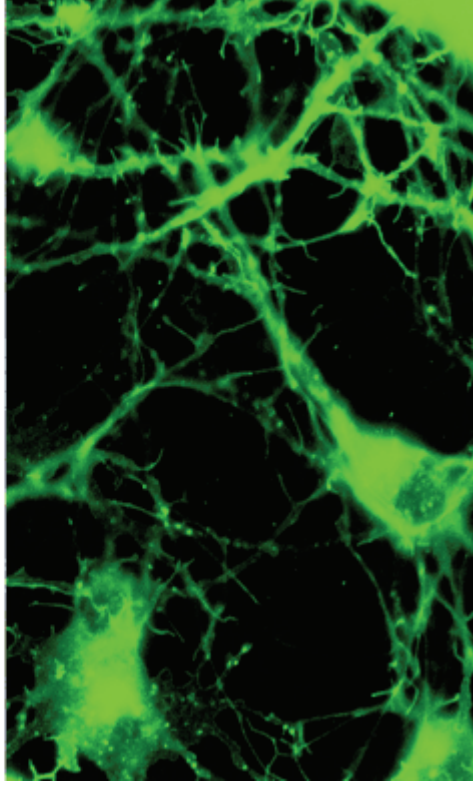
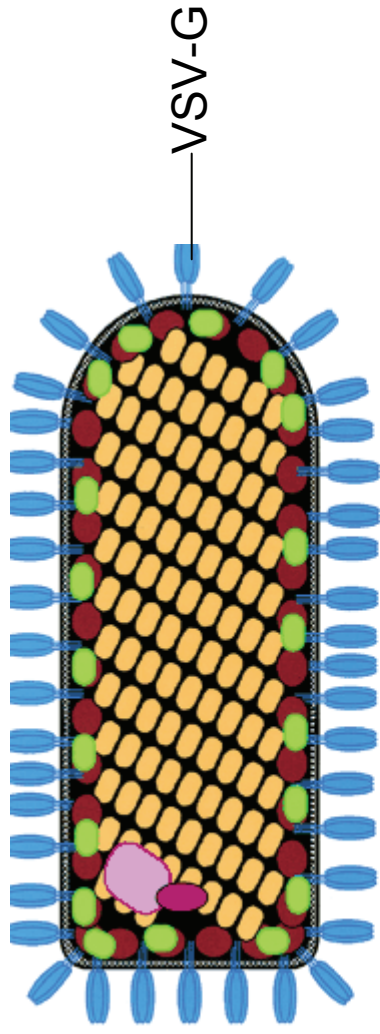
- Imunitní odpověď
- Náhodné začlenění do genomu (mutagen)
- Velikost je limitem průniku do některých tkání (CNS)



Lentivirus (HIV)

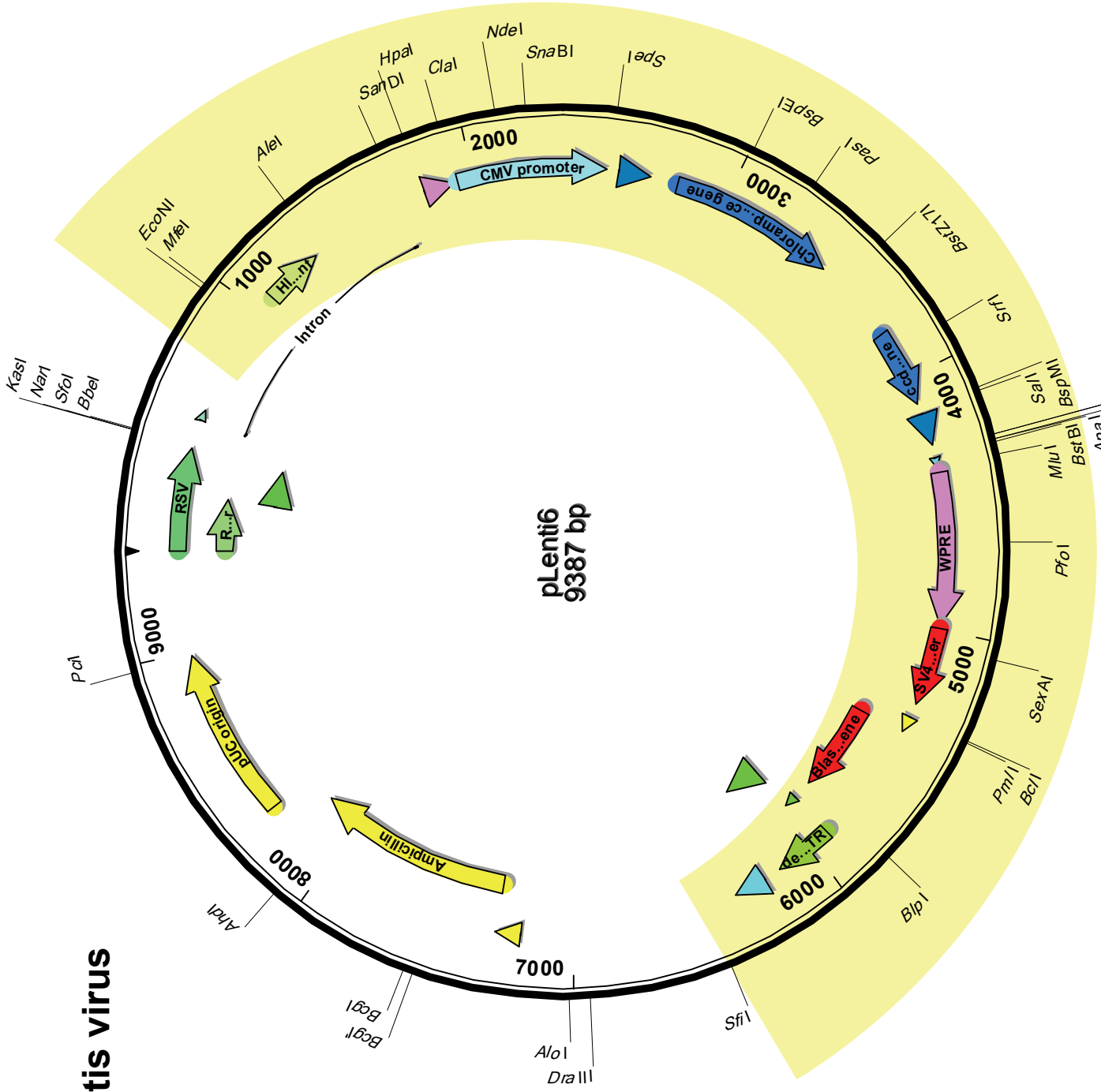


VSV-virus vesikulární stomatitidy



Neurony infikované rekombinantním VSV nesoucím gen pro GFP

Cytomegalovirus
Woodchuck hepatitis virus
Bakteriofág M13
SV40
HIV



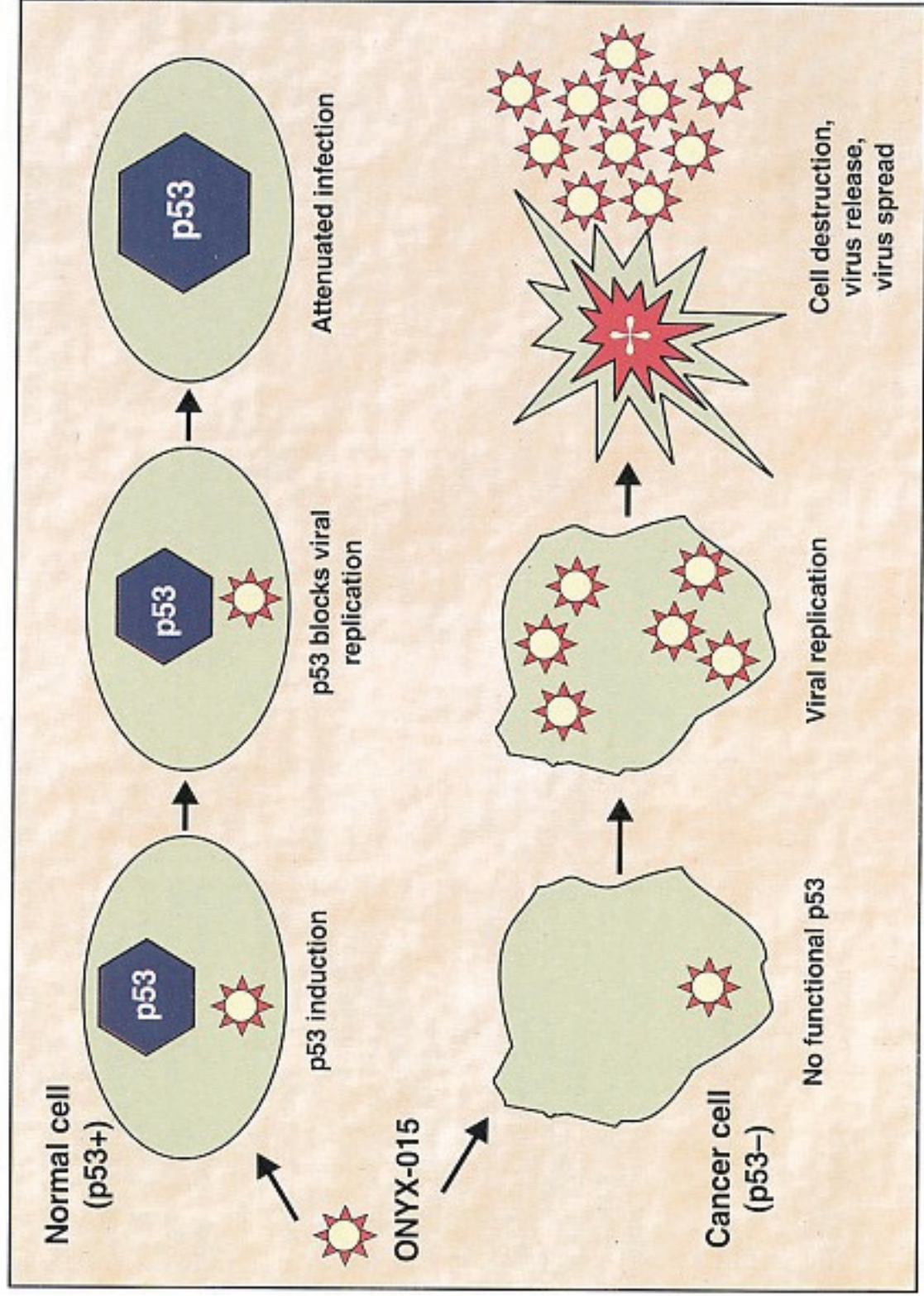


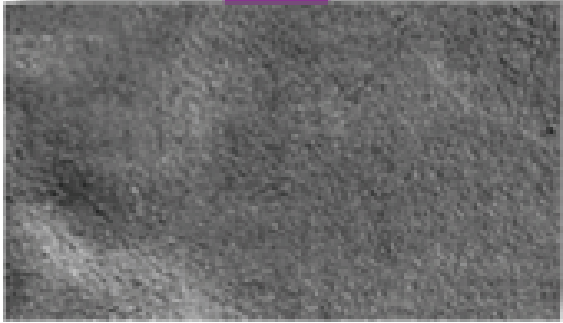
Figure 1: Selective Effect of ONYX-015 on p53-Deficient Cells—The adenovirus ONYX-015 is under development to treat tumors lacking p53 function. Hypothetically, cancer cells lacking functional p53 would be sensitive to viral replication and subsequent cytopathic effects.

Transfekce samotné DNA

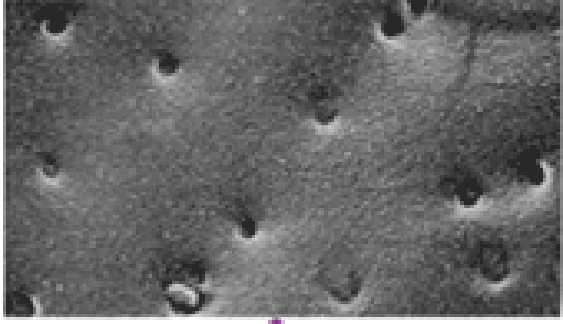
- Lipofekce
- Elektroporace
- Dendrimery
- Polymer (PEG)
- Gene gun

Elektroporace

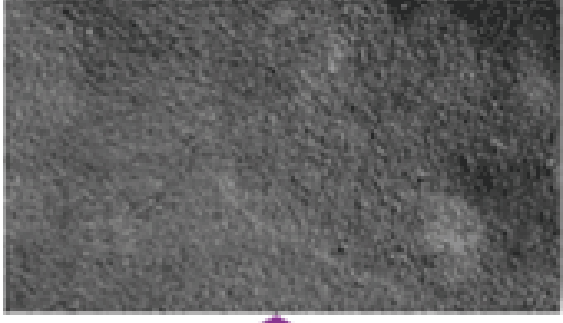
The phenomenon of electroporation



Cell membrane
before pulsing



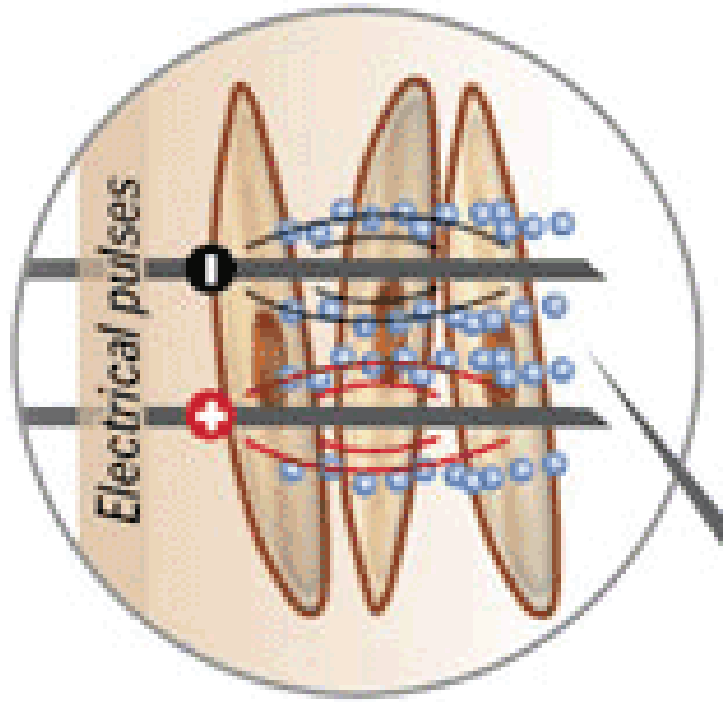
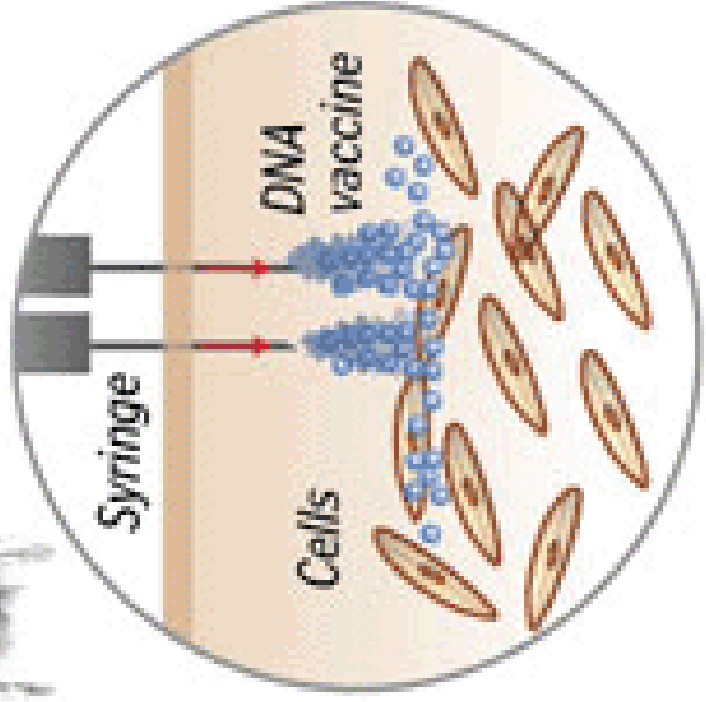
Cell membrane
during pulsing



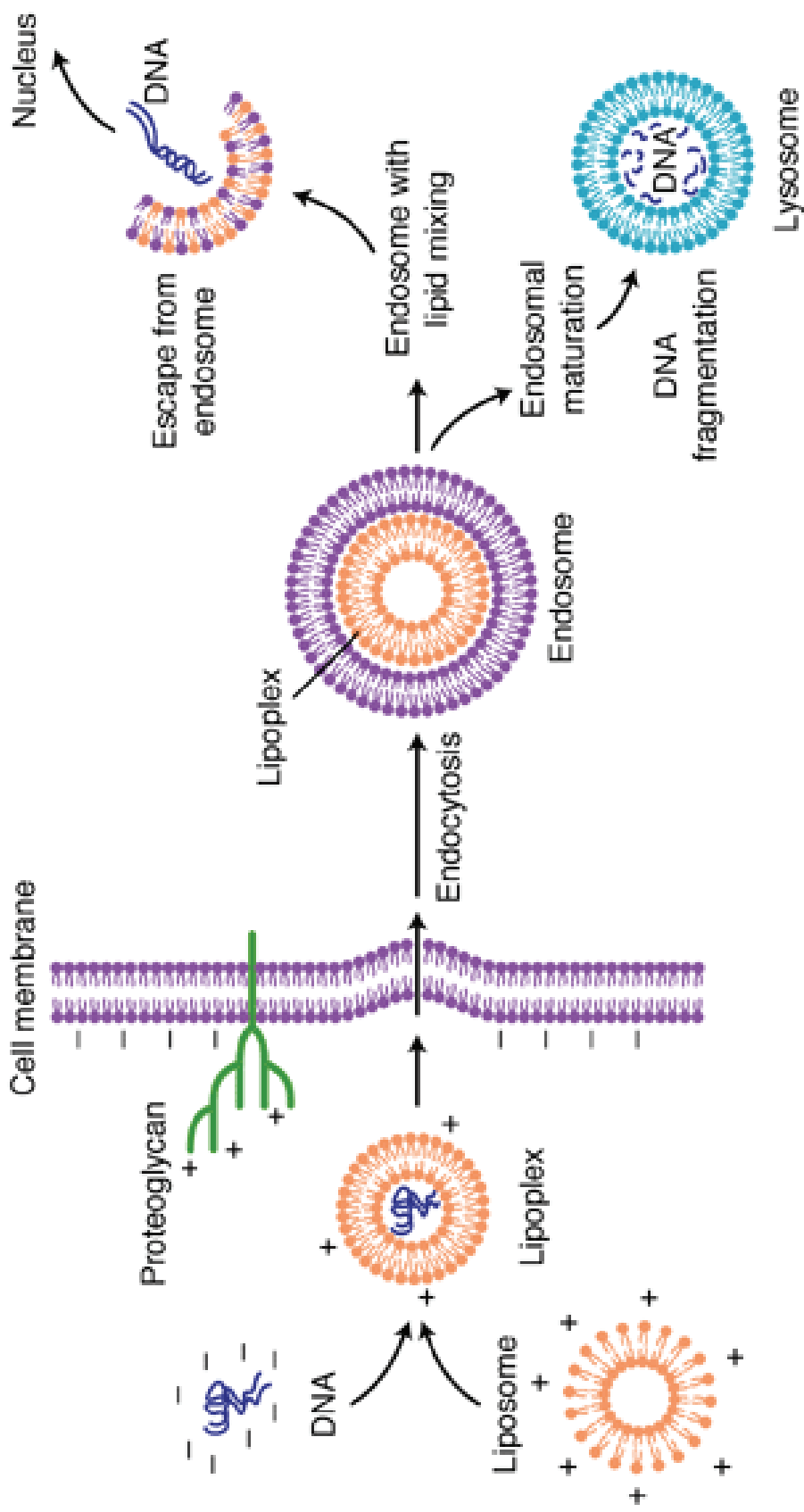
Cell membrane
after pulsing
(cell returns to



Figure 1



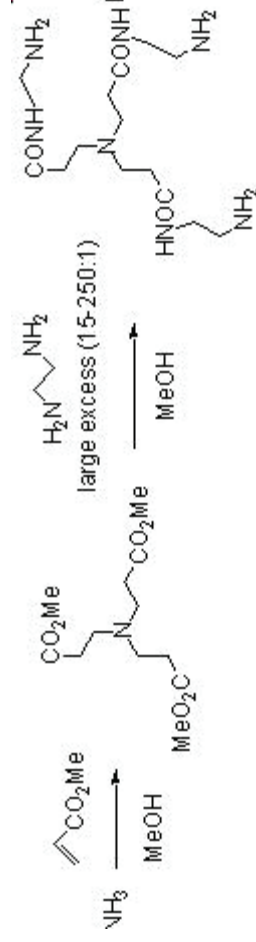
Lipofekce













Lipoplex-mediated transfection and endocytosis

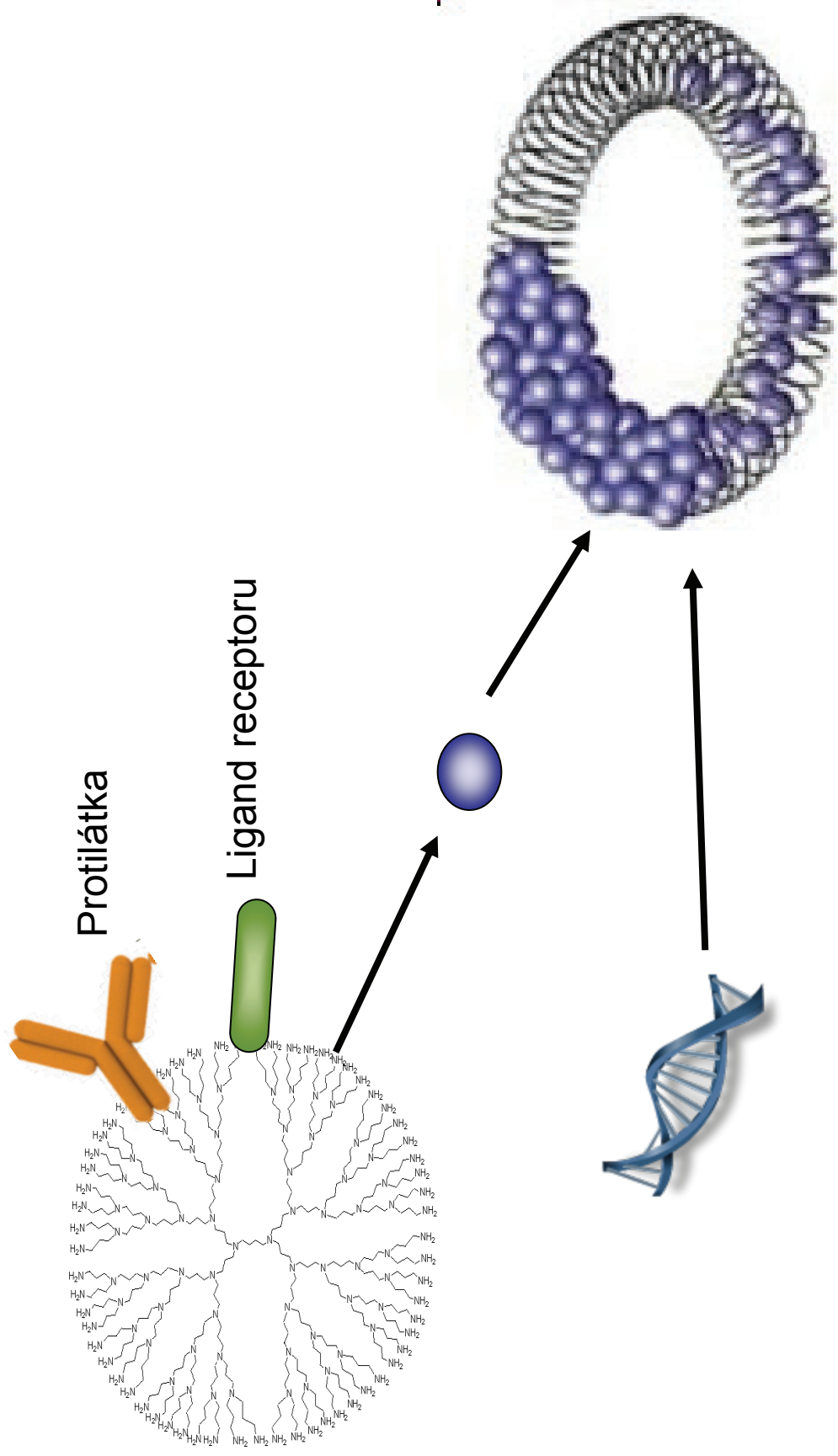
Expert Reviews in Molecular Medicine © 2003 Cambridge University Press

Dendrimery



PAMAM (polyamidoamine)

Generation	G0	G1	G2	G3	G4
# of Surface Groups	3	6	12	24	48
Diameter (nm)	1.4	1.9	2.6	3.6	4.4
2D Graphical Representation					
3D Chemical Structure View					

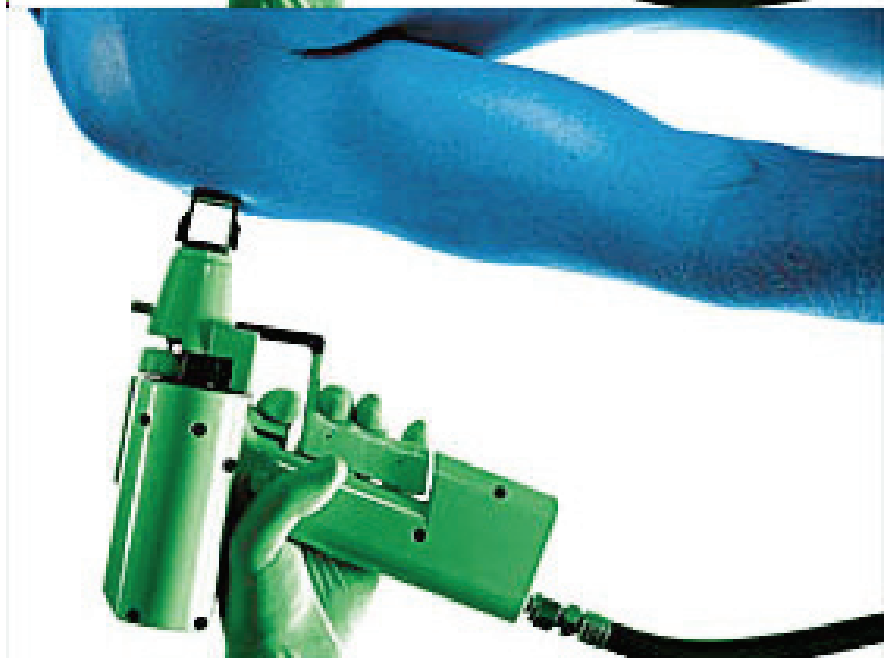
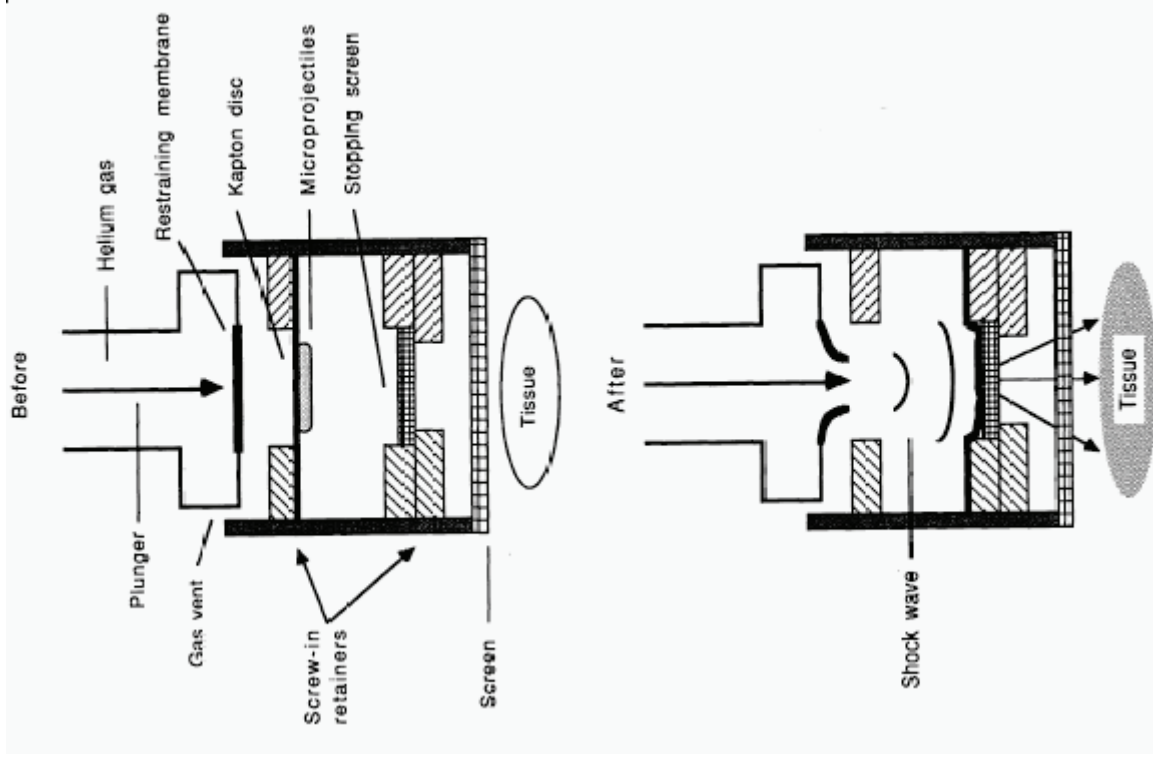


Protilátka

Ligand receptoru

Komplex DNA-dendrimer

Gene gun



Etické aspekty

- Klonování zárodečných kmenových buněk a jejich použití pro genovou terapii
- Definice nemoci, normality
- Zneužití, doping