

Možnosti modifikace genomu

Genová terapie, její principy a možnosti

Eduard Kočárek

Zimní semestr 2025/2026

Současný stav léčby geneticky podmíněných chorob

- Většinou se provádí pouze **symptomatická léčba** – tj. úprava či odstranění určitých projevů choroby, např.:
 - Dieta (u některých metabolických chorob, např. fenylketonurie – viz přednáška)
 - Rehabilitace (korekce pohybových vad)
 - Medikace; např. léčba růstovým hormonem (u růstových retardací), hormonální léčba (u poruch reprodukce), podání chybějícího metabolického produktu (u metabolických vad), podání látek ovlivňujících činnost nervového systému (u nervových a psychiatrických chorob)
 - Chirurgické zákroky (odstranění či korekce vrozených vývojových vad)
 - Transplantace; např. transplantace plic u cystické fibrózy, transplantace kostní dřeně u poruch imunity, transfúze krve či krevních derivátů u hemofilie...
- Kauzální léčba (tj. odstranění příčiny choroby, tedy mutace) pomocí **genové terapie** zatím aplikována jen zřídka a ve specifických případech (pro finanční a technickou náročnost, nejisté výsledky a rizika, úzkou zacílenost na konkrétní mutace)

Choroba SCID jako kandidátní choroba pro genovou terapii

- SCID = *severe combined immunodeficiency* (neboli **těžká kombinovaná imunodeficience**)
- Autozomově recesivní choroba způsobená mutací genu ADA kódujícího enzym adenosindeaminázu.

Chlapec postižený SCID musí žít v absolutně sterilním prostředí (v „bublině“), neboť mu nefunguje imunita.

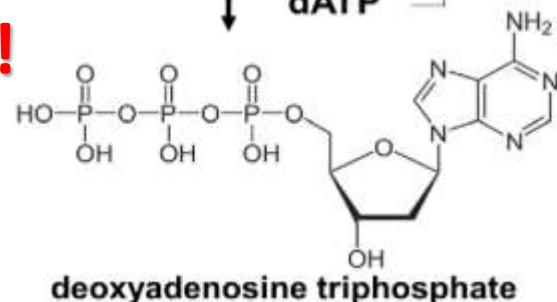
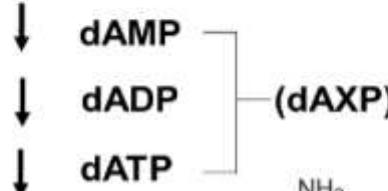
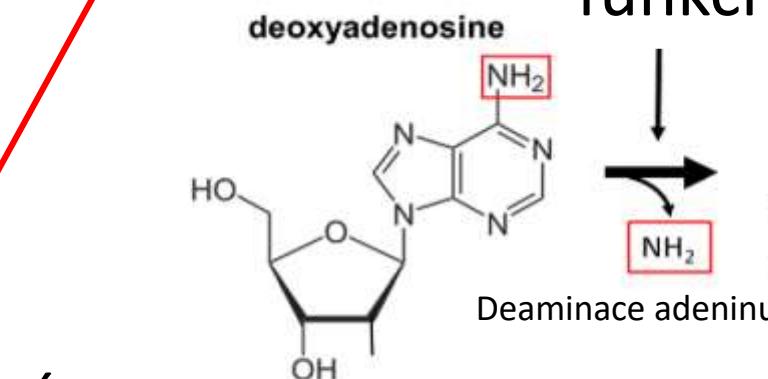


Proč musí děti trpící SCID žít v „bublině“?

Adenosindeamináza (ADA)

funkční

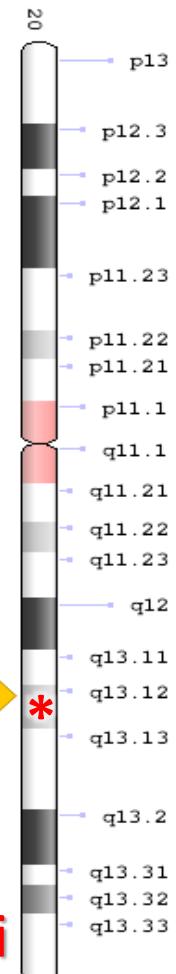
Všechno moc
škodí!



Gen ADA

Deoxyadenosintrifosfát
je ve vysoké koncentraci toxický vůči bílým krvinkám!

Chromozom 20



Jak „bublinovým dětem“ pomoci?

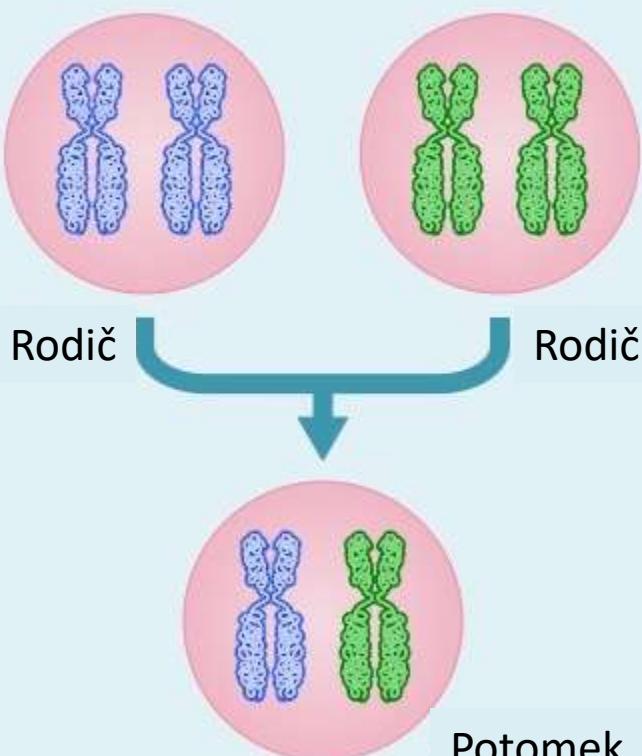
- Život v bublině, přísná ochrana před jakoukoli infekcí
- Transplantace kostní dřeně (dlouhá doba čekání na dárce s nejistými výsledky)
- Injekční aplikace adenosinendeaminázy (opakovaná, celoživotní)
- A což takhle **genová terapie...?**

Princip klasické genové terapie

= horizontální přenos genetické
informace

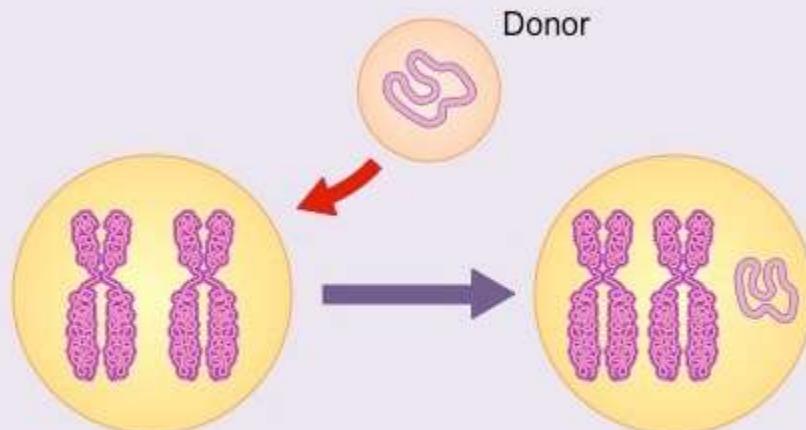
Vertikální a horizontální přenos genetické informace (viz též přednášku „Genetika prokaryot a virů“)

Vertikální přenos genu



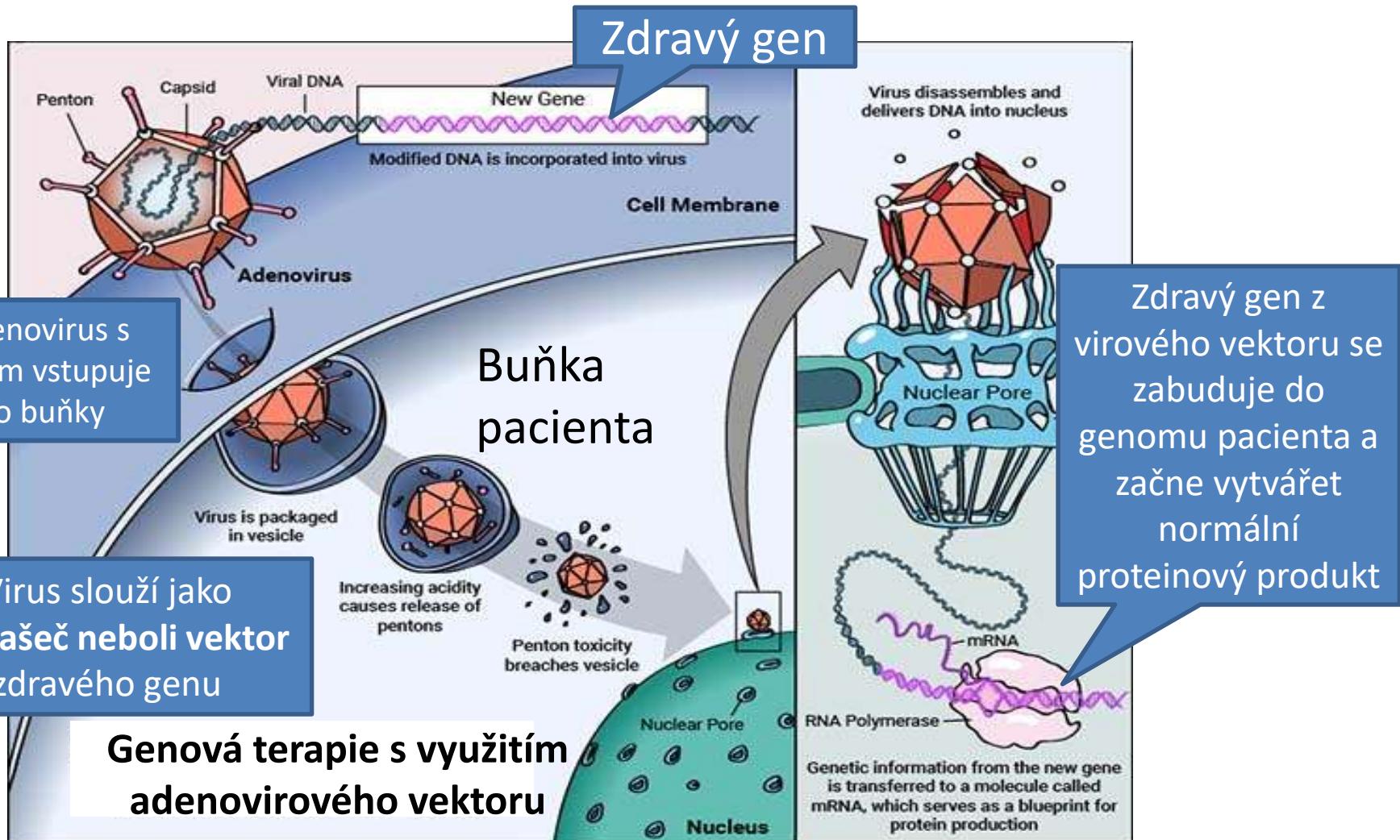
Horizontální přenos genu

Příklad: transformace a transdukce u bakterií

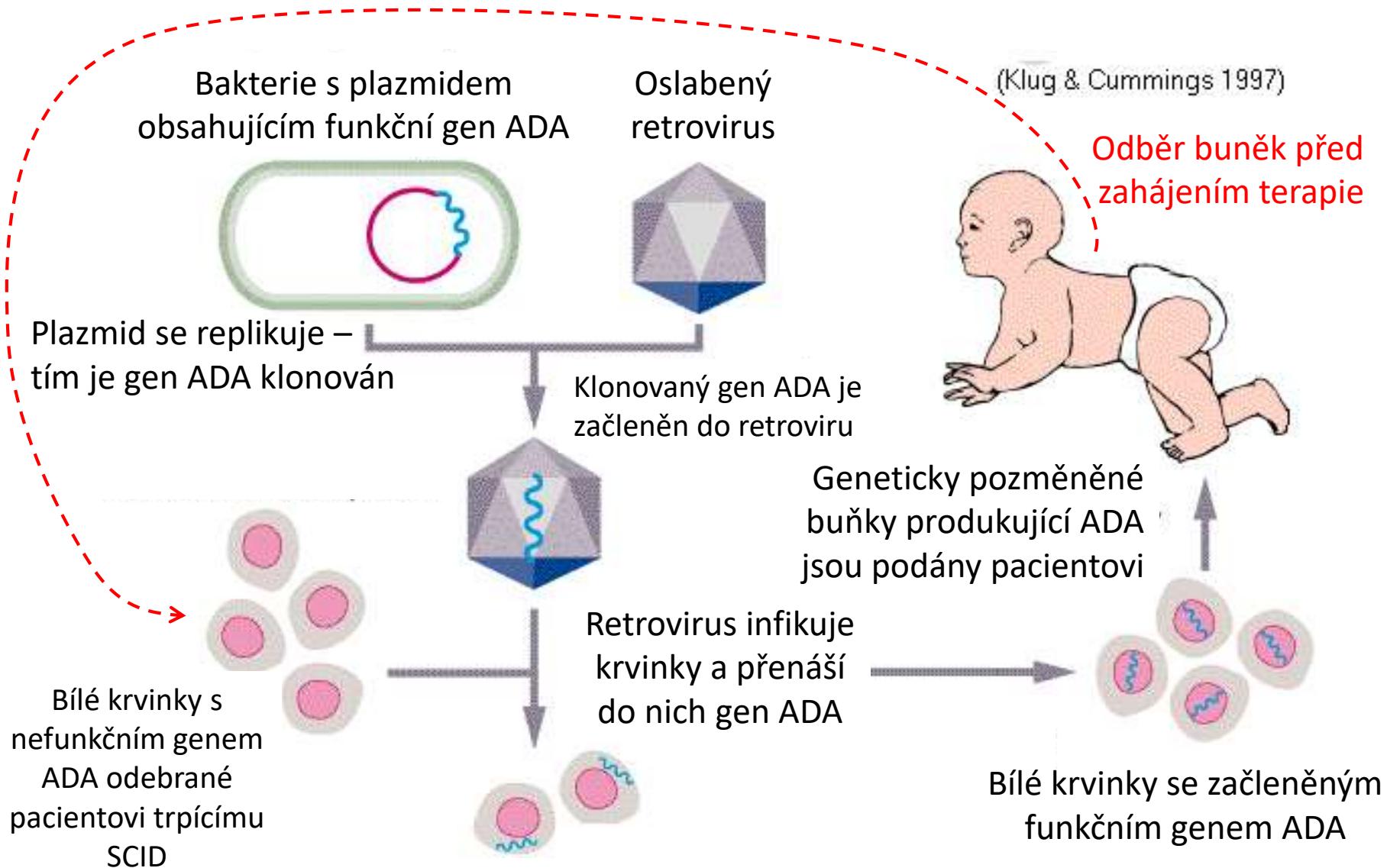


Transgenní organismus = jakýkoliv organismus, do něhož byla vložena cizí genetická informace.

Původní verze genové terapie – přenos zdravého viru do buňky pomocí viru (adenoviru nebo retrovíru)



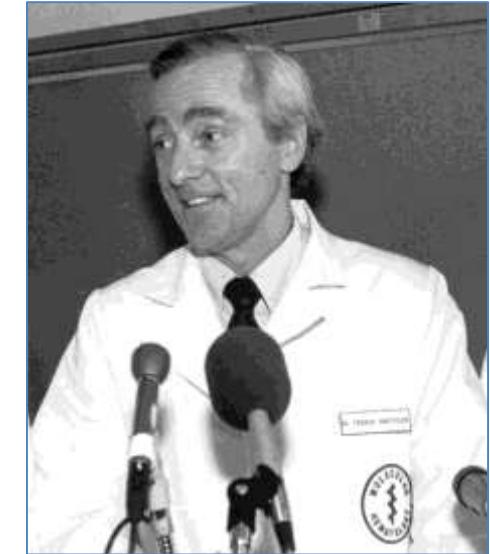
Genová terapie SCID



První úspěchy genové terapie

- V září 1990 americký lékař **William French Anderson** vyléčil genovou terapií čtyřletou **Ashanti DaSilva**, která trpěla SCID.

- Bílé krvinky z krve pacientky byly infikovány *in vitro* retrovirovým vektorem nesoucím nepoškozený ADA-gen, který se integroval do jejich genomu. Takto upravené bílé krvinky byly zavedeny zpět do těla pacientky.
- Po 10 měsících se u Ashanti zřetelně zlepšila funkce imunitního systému a v krvi se objevily bílé krvinky s opraveným genem ADA.



WILLIAM FRENCH
ANDERSON
(nar. 1936)

- O 4 měsíce později vyléčil Anderson se svým týmem stejným způsobem devítiletou **Cindy Cutshall (Kisik)**.

Terapie obou dívek byla úspěšná...

1992

W. F. ANDERSON

MICHAEL BLAESE



2013

ASHANTI SILVA

CINDY CUTSHALL



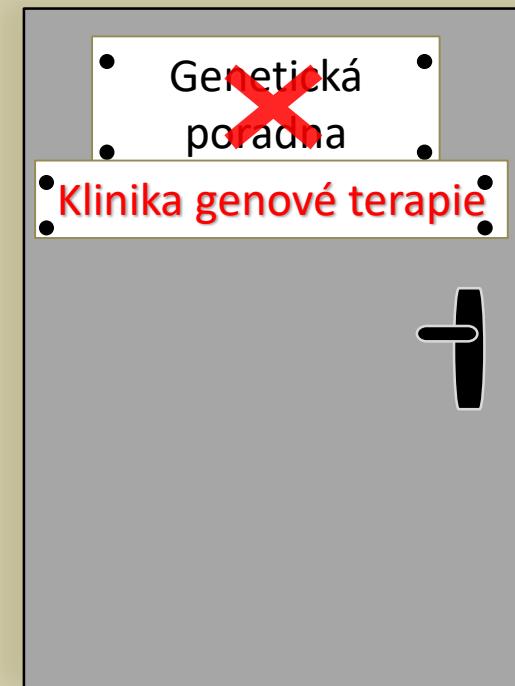
Courtesy of Dr. Kenneth Culver, Novartis Pharmaceuticals Corp.

<https://primaryimmune.org/first-gene-therapy-patients-attend-conference>

Všechno vypadalo nadějně...

V roce 2000 oznámil tým francouzských lékařů úspěšné **vyléčení 12 chlapců trpících SCID pomocí přenosu nepoškozeného genu.**

Předpokládalo se, že v průběhu několika málo let vzniknou po celém světě kliniky genové terapie



Studená sprcha...

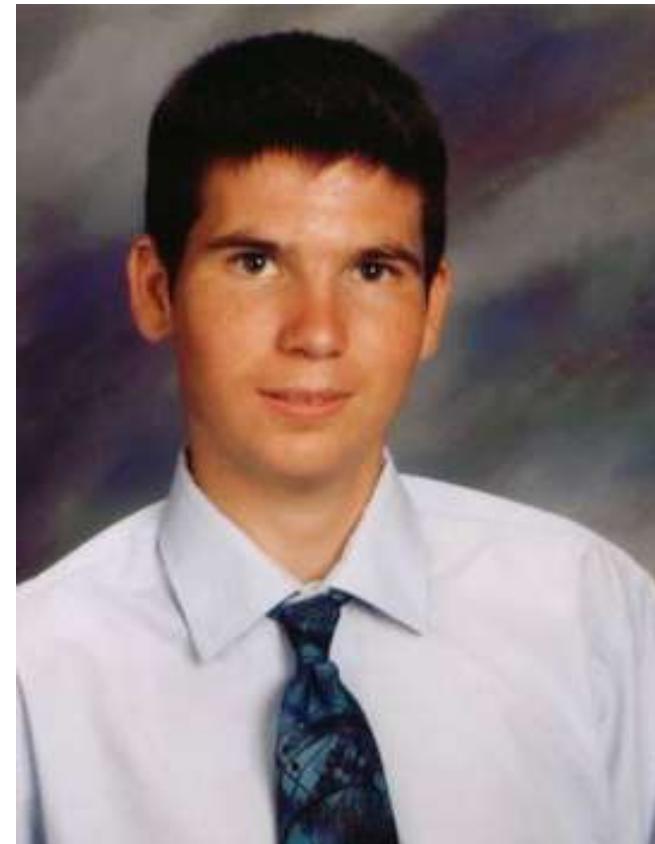


- Zmíněným 12 chlapcům trpícím SCID a léčeným klasickou genovou terapií se imunita obnovila. ☺
- U tří ale po několika letech propukla leukémie a jeden na toto onemocnění zemřel. ☹
- **Základní problém: nevíme, kam se zdravý gen zabuduje!** (problém tzv. inzerční mutageneze – viz přednášky o genomu a virech)

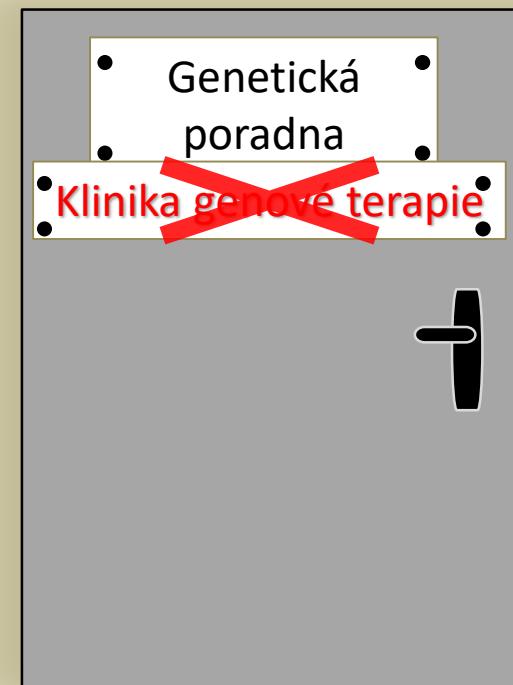
Další studená sprcha...



- JESSE GEISINGER (1981 - 1999), jenž trpěl metabolickou poruchou (deficiencí ornitin transkarbamylázy), zemřel po aplikaci genové terapie využívající virový vektor.
- Virový vektor (adenovirus) zřejmě vyvolal neadekvátní imunitní reakci.



Genová terapie byla zakázána,
výzkumné projekty se potýkaly s
nedostatkem finanční podpory...



Jak dál?



Nešlo by genovou terapii zacílit přesněji?

Možné řešení: bakteriální systém CRISPR-Cas

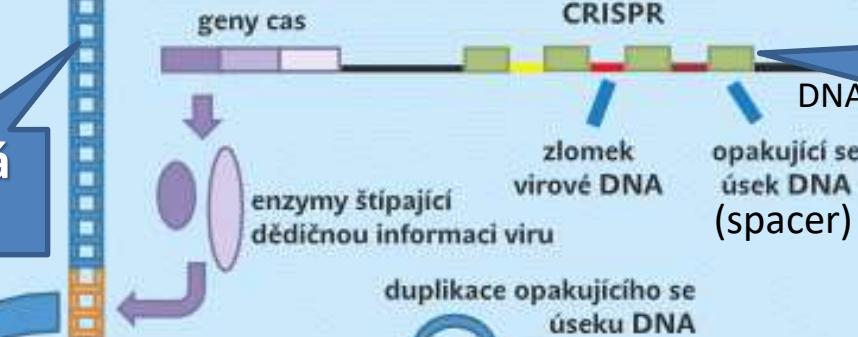
- Systém, jímž bakterie ničí DNA bakteriofága a je schopna si pro případ další infekce tímto fágem „zapamatovat“ tuto DNA (v podstatě jakási bakteriální imunita)
- CRISPR-Cas systém obsahuje:
 - genový úsek CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)
 - geny kódující enzymy Cas (*CRISPR associated genes* = helikázy a nukleázy, které štěpí DNA bakteriofága)

Che,
che,
che!!!

CRISPR systém, aneb jak bakterie vyzraje na virus?

Bakteriofág, jenž vpravuje svou DNA do buňky

Fágová DNA



zlomek virové DNA zařazen do úseku CRISPR

rozdělení molekuly RNA na krátke úseky

spojení „vyhledávací“ RNA s enzymem Cas9

DNA bakteriofága



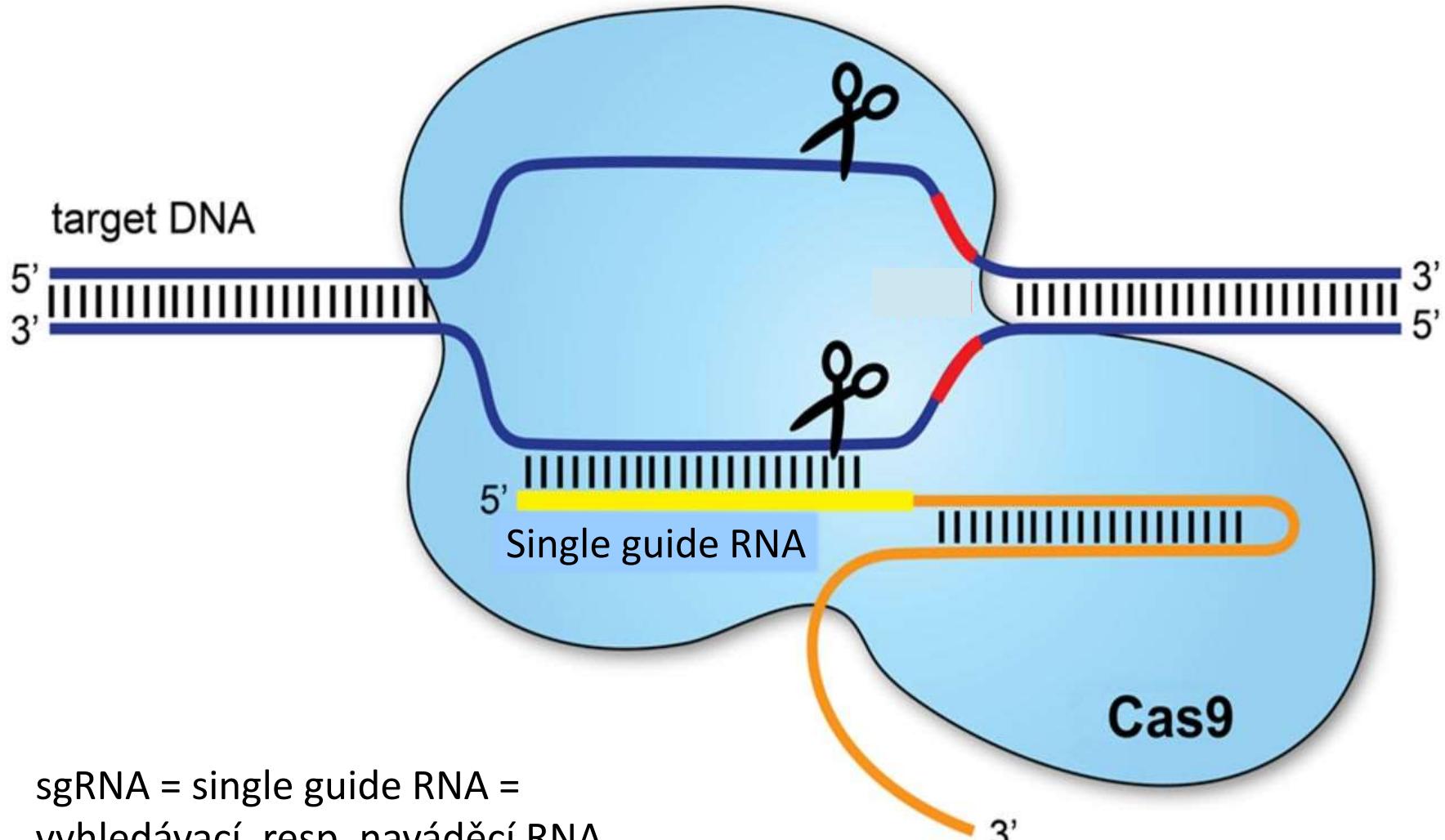
Úsek CRISPR obsahuje zařazené zlomky fágové DNA, oddělené tzv. spacery

Úsek CRISPR se transkribuje do dlouhé molekuly RNA, která je pak rozštěpena na malé „vyhledávací“ RNA (neboli *guide RNA*)

Enzym Cas 9

Pomóóóc!!!

CRISPR-Cas9 systém, aneb správně zacílené nůžky...

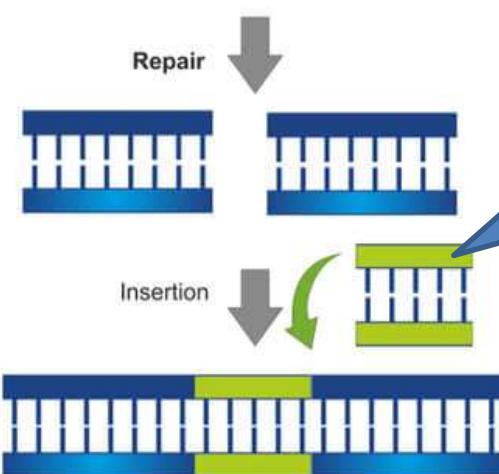
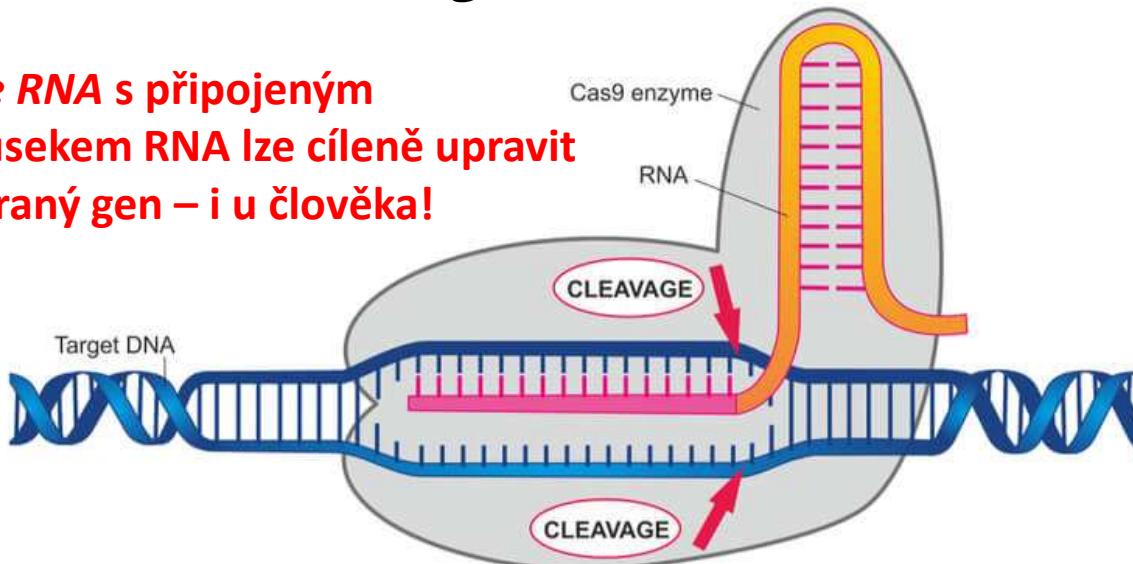


sgRNA = single guide RNA =
vyhledávací, resp. naváděcí RNA

K čemu je to dobré?

Pomocí *guide RNA* s připojeným specifickým úsekem RNA lze cíleně upravit jakýkoliv vybraný gen – i u člověka!

Úsek DNA
určený k
modifikaci



Možnost vložení nového úseku DNA (např. za účelem „záplatování“ poškozeného genu)

Možné využití techniky CRISPR-Cas9

- Genová terapie monogenních chorob prostřednictvím **cílené genové editace**.
- Léčba nádorových chorob (likvidace mutovaných genů v nádorech)
- Léčba infekcí – likvidace DNA bakterií a virů – „Krisprová antibiotika, resp. antivirotika“
 - V současnosti úspěšně testováno na myších krisprové antivirotikum proti AIDS
- Cílená inaktivace (knokaut) genů v modelových organismech

2017 – rok plný novinek

- Březen 2017: Opraven gen v lidském embryu (zatím jen experimentálně)
- Říjen 2017 – technika CRISPR2 – možnost cíleně měnit jednotlivé nukleotidy v daném genu.
- Konec roku 2017 – pokus o cílenou genovou terapii technikou příbuznou metodě CRISPR přímo v lidském těle – léčba Hunterova syndromu

2018

- Čínský biofyzik Che Ťien-kchuej oznámil, že použil metody editace genů CRISPR-Cas9, aby změnil gen CCR5 u embryí dvojčat (Nana a Lulu). Cílem genové manipulace bylo údajně dosáhnout odolnosti vůči viru HIV, jímž byl infikován otec dvojčat.
- Velmi kontroverzní případ, prokázána zásadní pochybení, imunitu vůči AIDS má možná jen jedno z dvojčat.

Problémy kolem genové editace

- Nepovede modifikace technikou CRISPR k sebedestrukci buňky (prostřednictvím apoptózy)?
 Resp. abychom nevyselektovali ty buňky, které mají poškozené mechanismy apoptózy (= nefunkční gen TP53)
- Riziko necílových zásahů (minutí cílové sekvence) – nyní údajně eliminováno.
- Technikou CRISPR vznikají až příliš odolné geny, které mohou pronikat do dalších organismů.
- Eticky problematické pokusy s lidskými embryi!
- Další etický problém – snadnější genetické modifikace u lidí – eugenika v novém hávu – vyšlechtění „nadčlověka“?

Další možné postupy genové terapie

- Modulátorová léčba – ovlivnění funkce defektního proteinu (používá se u některých případů cystické fibrózy).
- Úprava syntézy RNA, resp. editace RNA syntetizované z defektního genu.

Na shledanou!

