

Možnosti modifikace genomu

Genová terapie, její principy a možnosti



Eduard Kočárek

Zimní semestr 2025/2026

pinterest.com

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“?

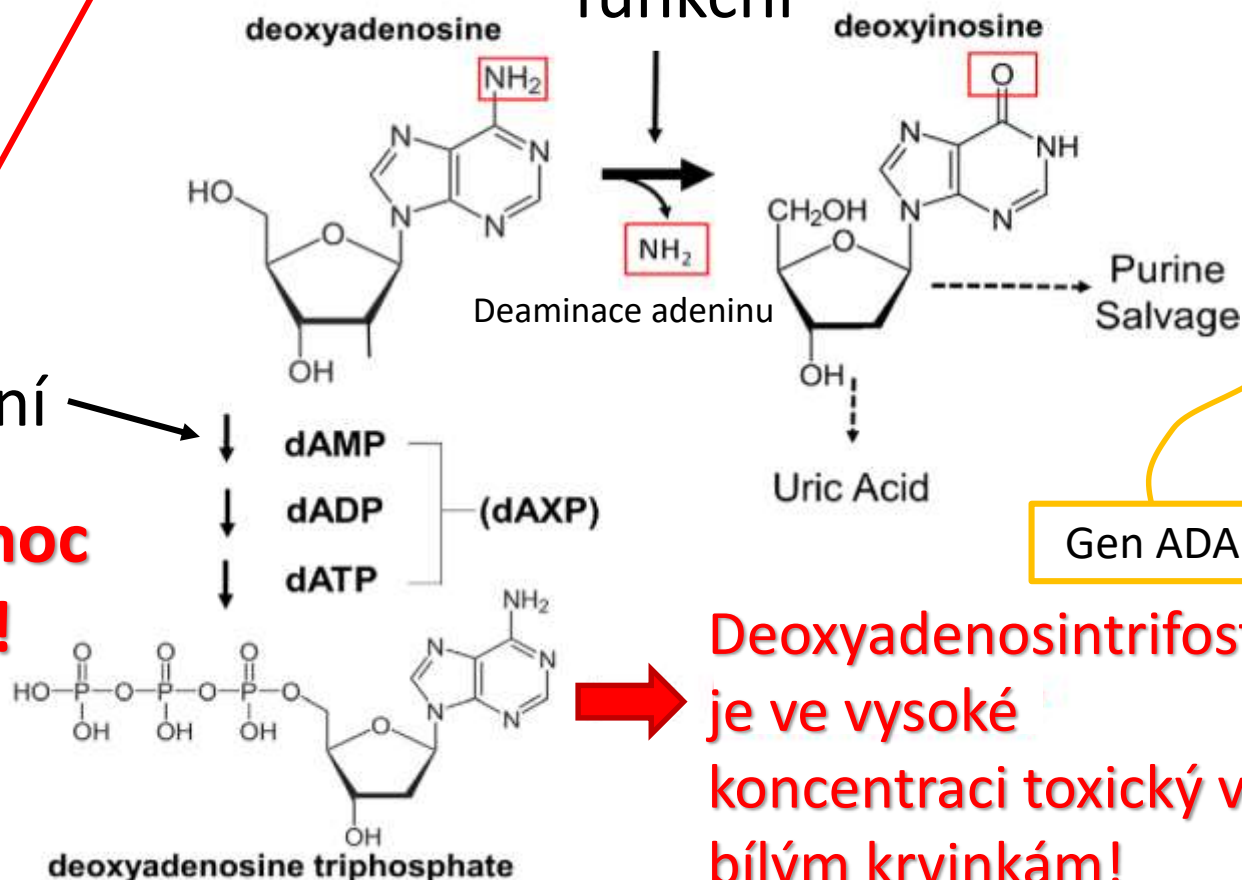
Adenosindeamináza (ADA)

Chromozom 20

funkční

nefunkční

Všeho moc škodí!



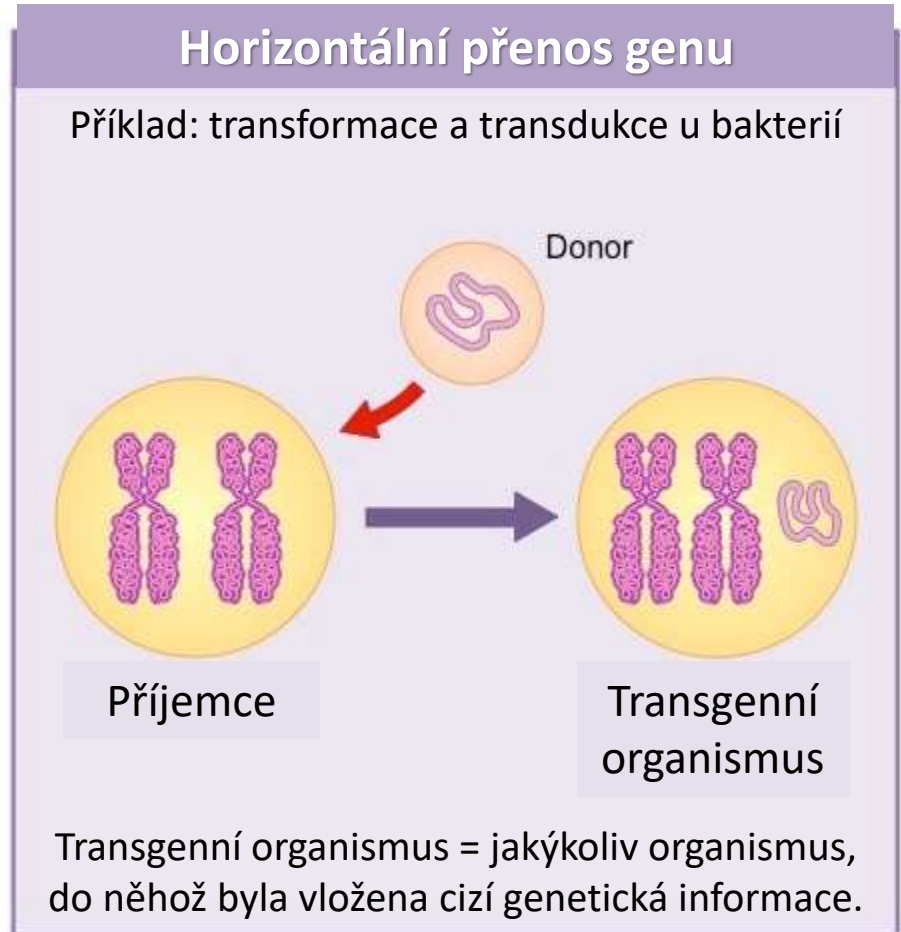
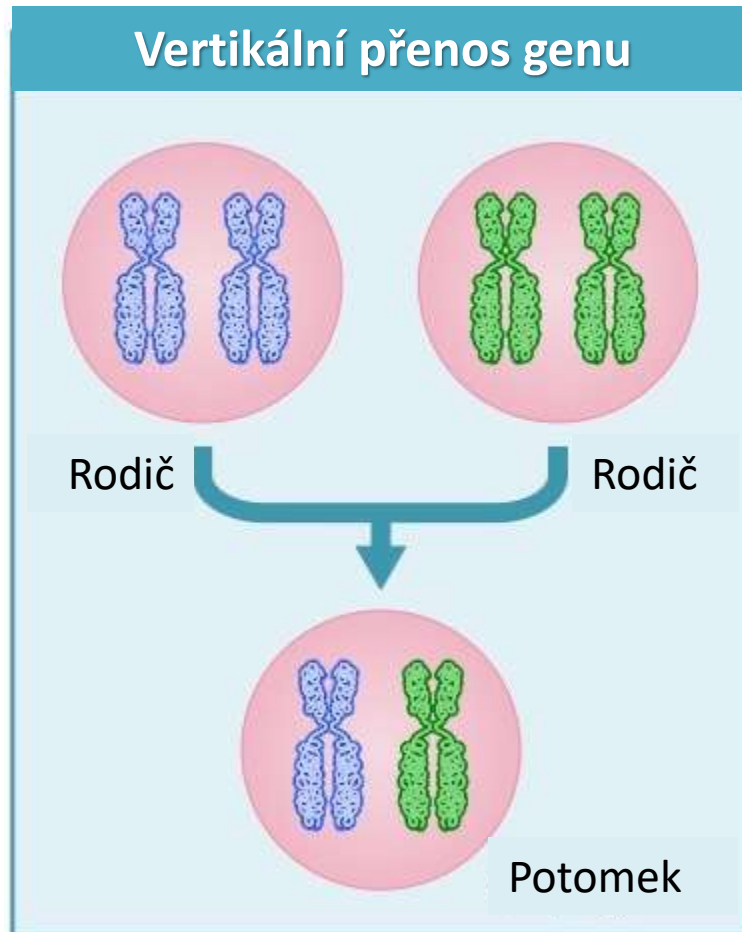
Deoxyadenosintrifosfát je ve vysoké koncentraci toxický vůči bílým krvinkám!

Jak „bublinovým dětem“ pomoci?

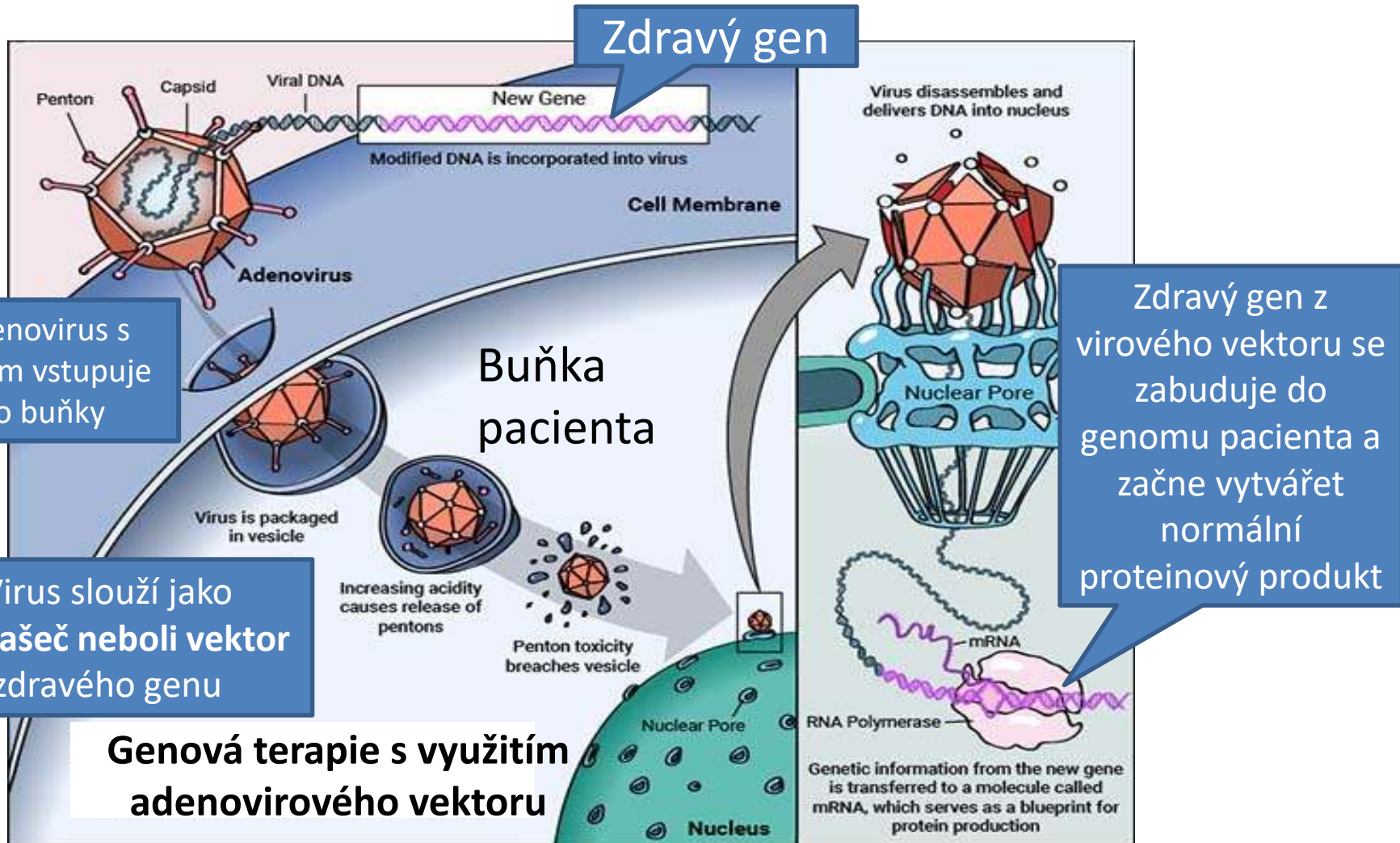
- Život v bublině, přísná ochrana před jakoukoli infekcí
- Transplantace kostní dřeně (dlouhá doba čekání na dárce s nejistými výsledky)
- Injekční aplikace adenosindeaminázy (opakovaná, celoživotní)
- A což takhle **genová terapie**...?

Princip klasické genové terapie
= **horizontální** přenos genetické
informace

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



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



Genová terapie SCID

Bakterie s plazmidem
obsahujícím funkční gen ADA

Oslabený
retrovirus

(Klug & Cummings 1997)

Odběr buněk před
zahájením terapie

Plazmid se replikuje –
tím je gen ADA klonován

Klonovaný gen ADA je
začleněn do retroviru

Geneticky pozměněné
buňky produkující ADA
jsou podány pacientovi

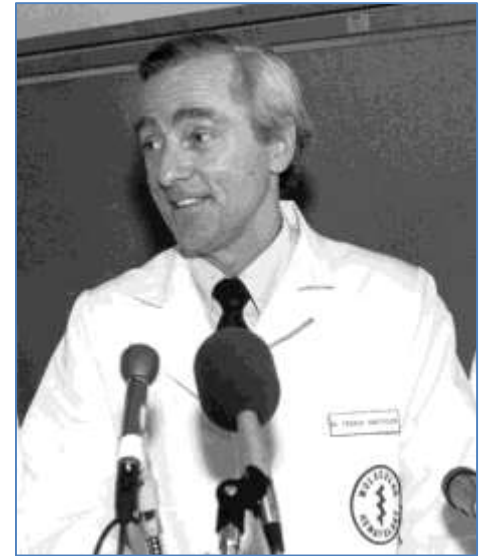
Retrovirus infikuje
krvinky a přenáší
do nich gen ADA

Bílé krvinky s
nefunkčním genem
ADA odebrané
pacientovi trpícímu
SCID

Bílé krvinky se začleněným
funkčním genem ADA

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



WILLIAM FRENCH
ANDERSON
(nar. 1936)

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)

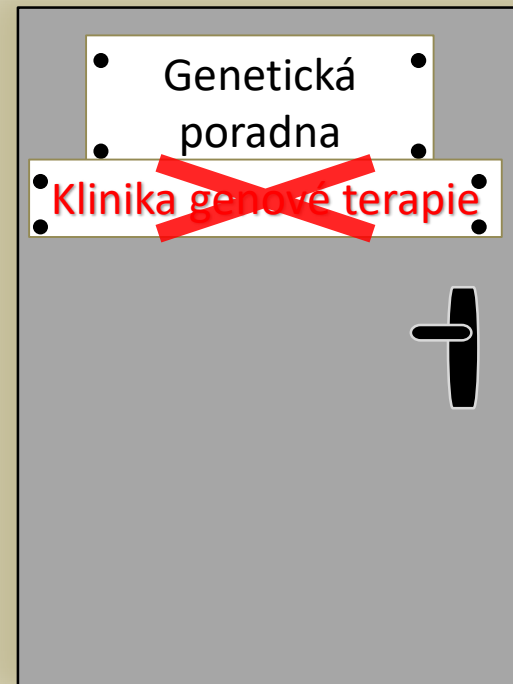
Další studená sprcha...



- JESSE GEISINGER (1981 - 1999), jenž trpěl metabolickou poruchou (deficiencí ornitin transkarbamylyázy), 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

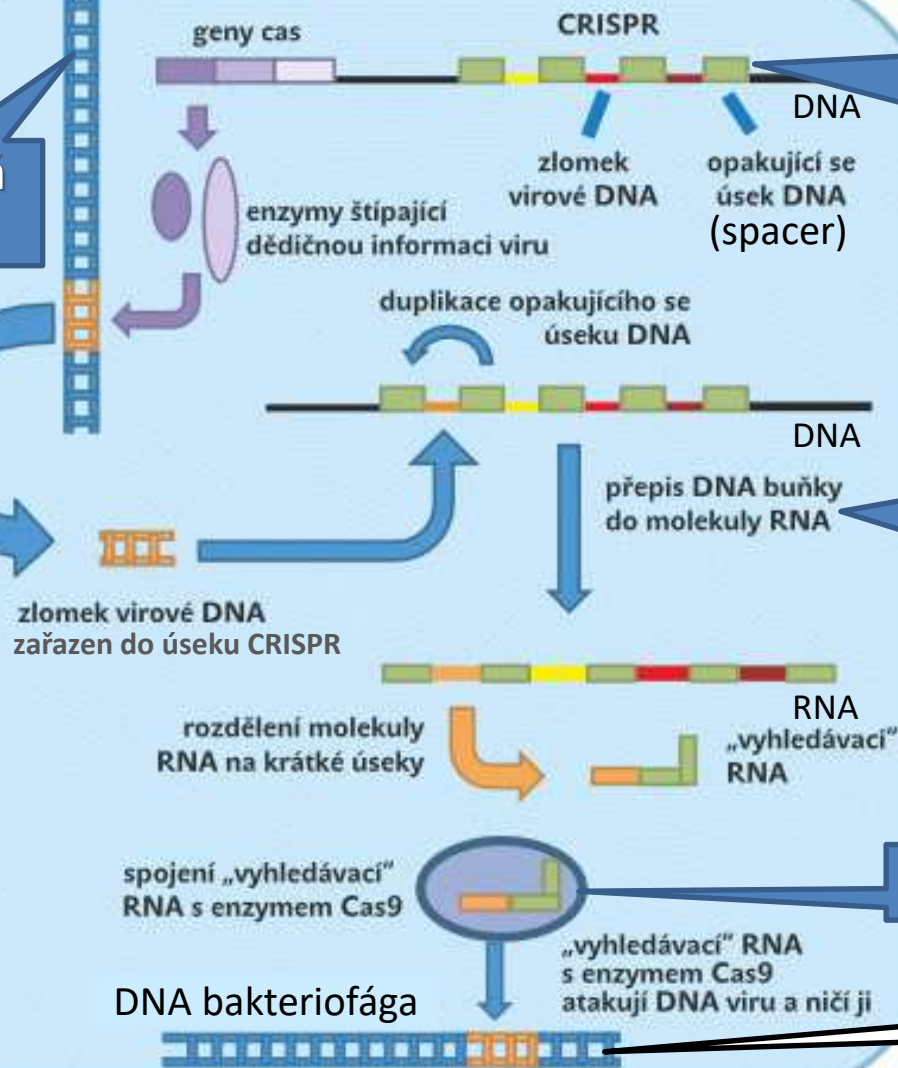
- Systém, jímž bakterie ničí DNA bakteriofága a je schopna si pro případ další infekce tímto fágem „zapamatovat“ tuto DNA (v podstatě jakási bakteriální imunita)
- CRISPR-Cas systém obsahuje:
 - genový úsek CRISPR (***C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats*)
 - geny kódující enzymy Cas (***C**RISPR **a**ssociated **g**enes* = 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



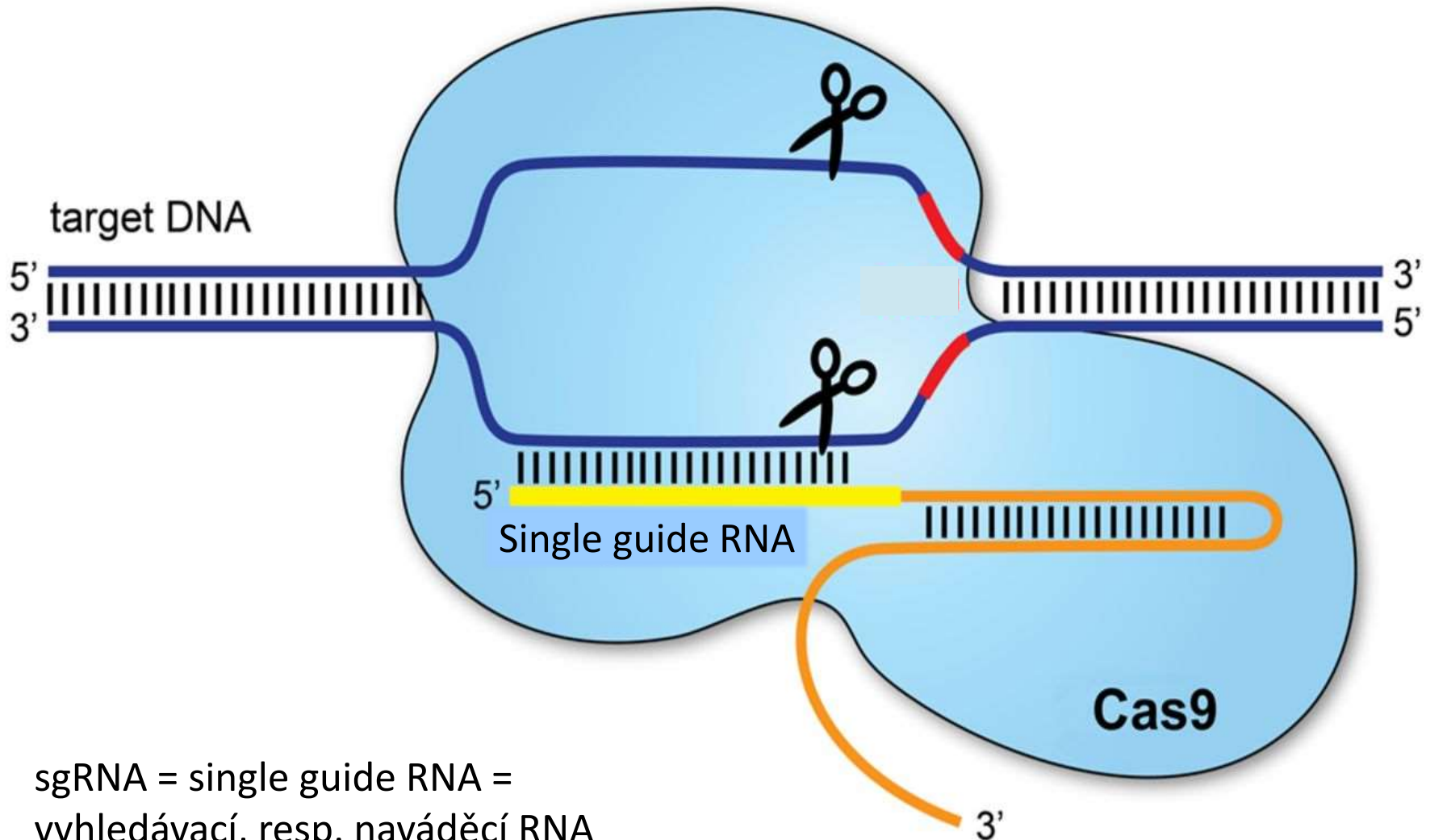
Úsek CRISPR obsahuje zařazené zlomky fágové DNA, oddělené tzv. spacers

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

Enzym Cas 9

Pomóóó!!!

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

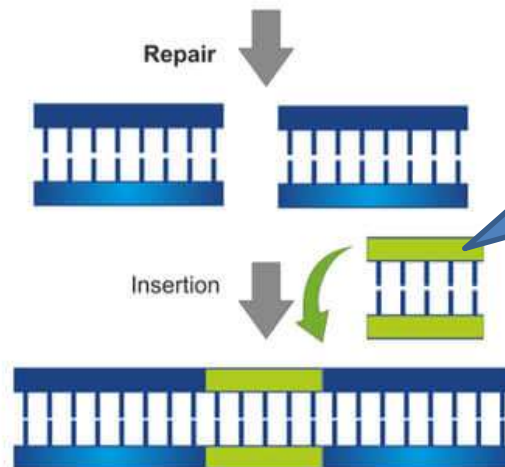
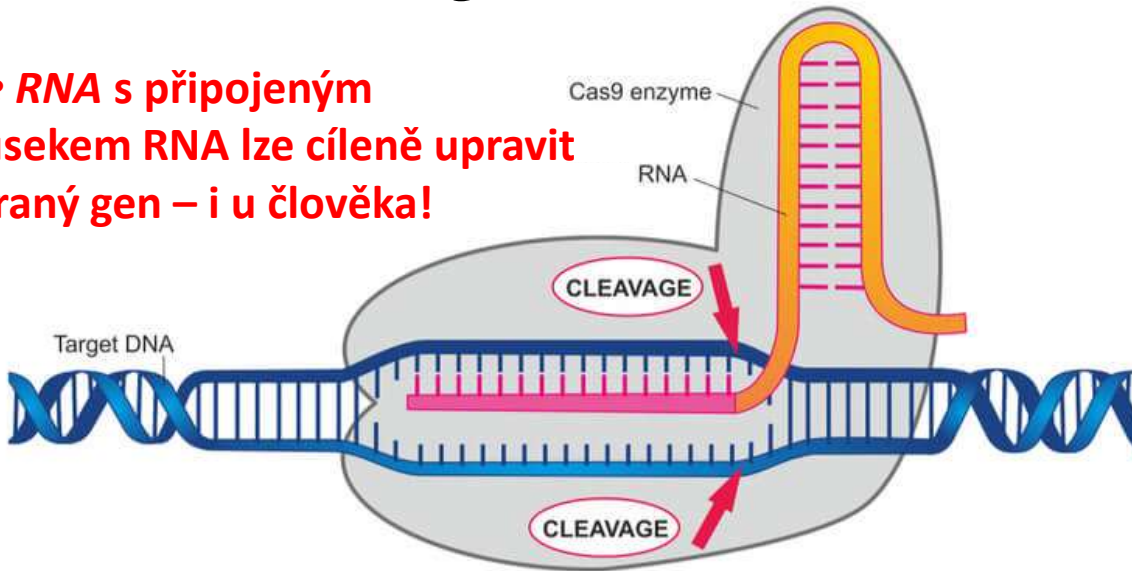


sgRNA = single guide RNA =
vyhledávací, resp. naváděcí RNA

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!

