

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2017

HANA ŠUBRTOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat



Metodické přístupy v genové terapii na zvířecích modelech
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
prof. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.

Vypracovala:
Hana Šubrtová

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Metodické přístupy v genové terapii na zvířecích modelech** vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše

V Brně dne:.....

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala prof. Ing. Tomáši Urbanovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu, vstřícnost a zejména trpělivost při odborném vedení mé bakalářské práce.

Abstrakt

V této bakalářské práci je pojednáváno o genové terapii jako o možné léčbě k řadě onemocnění. Jsou zde shrnuty obecné informace o genové terapii, její rozdělení a také pár důležitých milníků z historie, které významným způsobem přispěli k jejímu rozvoji. Následně se práce věnuje popisu nejčastěji používaných vektorů, přičemž u každého jsou zvláště vypsány jeho hlavní výhody a nevýhody, i příklady konkrétních nemocí, pro které je možné dané nosiče genů využít. Dále se práce zabývá metodami, jež jsou nejčastěji používány pro odhalení genové mutace, a krátkým shrnutím modelových organismů, které jsou vhodné pro výzkum genové terapie. Nakonec jsou zde popsány důležitá úskalí spojená s aplikací genové terapie.

Klíčová slova: Genová terapie, virové vektory, neviróvé vektory, metody detekce mutací, problémy genové terapie

Abstract

This bachelor thesis deals with gene therapy as a possible treatment for many diseases. It summarizes general information on gene therapy how it is divided and a few important milestones in history that have significantly contributed to its development. Subsequently, this thesis focuses on the most commonly used vectors. There are listed and described their main advantages and disadvantages as well as examples of specific diseases for which the given gene carriers can be used as a treatment. This thesis also deals with methods most commonly used to detect gene mutation and summarizes model organisms suitable for gene therapy research. Finally, problematic areas associated with the application of gene therapy are described here.

Key words: Gene therapy, viral vectors, non-viral vectors, methods of detecting mutations, gene therapy problems

OBSAH

1	Úvod	9
2	Cíl práce	10
3	Genová terapie	11
3.1	Gametická genová terapie	11
3.2	Somatická genová terapie	11
4	Nejvýznamnější objevy genové terapie	13
4.1	Objasnění transformačního principu	13
4.2	Objevení struktury DNA	15
4.3	Počátky genové terapie	15
5	Hlavní vektory pro genovou terapii	17
5.1	Virové vektory	17
5.1.1	Adenoviry	17
5.1.2	Adenoasociované viry	19
5.1.3	Retroviry.....	20
5.1.4	Lentiviry	21
5.2	Nevirové vektory.....	21
5.2.1	Fyzikální metody	22
5.2.2	Chemické metody	23
6	Metody genové terapie	25
6.1	MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)	25
6.2	MAPH (Multiplex amplification and probe hybridization)	26
6.3	qPCR (Real time PCR).....	27
6.4	Sekvenování	27
7	Modelové organismy	29
8	Úskalí genové terapie	31
8.1	Technické problémy	31

8.2	Etické problémy	32
9	Závěr	33
10	Použitá literatura	34

1 ÚVOD

Genová terapie je poměrně nová experimentální metoda, která má potenciální využití v léčbě celé řady lidských onemocnění, a to jak těch dědičných, tak i těch získaných v průběhu života jedince. Na vývoji genové terapie se podílelo mnoho významných událostí z historie.

Přenos požadovaných genů v genové terapii je zprostředkován pomocí vektorů, které mohou být virového, nebo nevirového původu. Každá skupina těchto možných nosičů skýtá své výhody i nevýhody. Často platí, že co je výhodou virových vektorů, je u těch nevirových nevýhodou a obráceně. Každý vektor může být využit pro různé druhy nemocí.

Před samotným zahájením genové terapie je nezbytné znát přesný výskyt mutace v genomu, která způsobuje dané onemocnění. Pro identifikaci těchto mutací existuje v genové terapii celá řada technologií, přičemž čtyři nejběžnější jsou blíže popsány níže. Dále je nutné před provedením genové terapie na člověku pozorování její úspěšnosti a možných nežádoucích účinků na modelových organismech.

Genová terapie, ač velmi nadějná metoda léčby nemocí, je také spojena s některými významnými problémy. Tato úskalí se týkají zejména technických a etických důvodů, které jsou úzce spojeny s obavou veřejnosti.

2 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce je popsat genovou terapii, její rozdělení a možné aplikace. Charakterizovat nejčastější vektory využívané v genové terapii s ohledem na jejich bezpečnost. Dále by měla popsat jednotlivé metody genové terapie a zohlednit etické aspekty, které jsou s genovou terapií spojené. V neposlední řadě by měla uvést příklady modelových organismů, které jsou v souvislosti s genovou terapií nejčastěji využívány.

Práce by měla být zpracována výhradně z vědeckých publikací, jako jsou vědecké časopisy a knihy, případně vědecky podložené informace získané z internetu.

3 GENOVÁ TERAPIE

Genová terapie je alternativním způsobem léčby, která se neustále vyvíjí a má potenciální využití u pacientů s mnoha dědičnými onemocněními jako je hemofilie, imunodeficitní dystrofie, rakovina a další. Jedná se o vnesení transgenu, tedy funkční kopie genu do organismu s nefunkční formou daného genu, za cílem opravy buněčné disfunkce nebo vnesení nové buněčné funkce. Takový organismus je poté nazýván transgenním (Snustad, Simmons, 2009; Cotrim, Baum, 2008).

U lidí se genová terapie může provádět jen podle uvedených podmínek, jež byly navrženy podle státní instituce v Americe National Institutes of Health:

- „1. Gen musí být klonován a dobře charakterizován.*
- 2. Musí být dostupná účinná metoda vnášení genu do cílových tkání nebo buněk.*
- 3. Musí se pečlivě zvažovat rizika genové terapie pro pacienta a musí být prokázáno, že tato rizika jsou minimální.*
- 4. Onemocnění nelze léčit jiným způsobem.*
- 5. Musí být dostupné výsledky předchozího testování na živočišných modelech nebo na lidských buňkách a tyto výsledky musí naznačovat, že navrhovaná genová terapie bude účinná.“* (Snustad, Simmons, 2009).

3.1 Gametická genová terapie

Rozlišují se dva typy genové terapie. Gametická neboli dědičná genová terapie se v současné době z etických důvodů provádí pouze experimentálně na zvířecích modelech, ale nikoliv na člověku. U tohoto typu genové terapie se funkční gen vkládá do zárodečných buněk, tedy do spermie nebo vajíčka. Z toho důvodu se změní všechny buňky jedince a ty jsou následně přenášeny do dalších generací. Tímto způsobem může dojít k úplnému odstranění poruchy (Snustad, Simmons, 2009; Nečas, 2000).

3.2 Somatická genová terapie

V tomto typu genové terapie se vnáší funkční kopie daného genu do somatických, nikoli zárodečných buněk a tyto geny nejsou tedy děděny na potomky. Somatická genová terapie již má několik aplikovatelných postupů pro praktické využití, přičemž některé už

byly použity i na člověka. Somatická genová terapie má obrovský potenciál pro budoucí léčbu onemocnění, avšak v současné době je třeba získat ještě spoustu dalších poznatků (Snustad, Simmons, 2009; Nečas, 2000).

Rozlišujeme dva základní přístupy:

1. Genová terapie *in vitro* - V tomto způsobu terapie jsou buňky, do kterých má být vložena standartní alela genu vyjmuty z těla, upraveny, namnoženy i s příslušným genem a až poté jsou vloženy zpět do těla pacienta. Nejideálnějšími buňkami pro takové použití jsou buňky z kostní dřeně. Tento typ terapie byl využit například pro léčbu onemocnění zvaného ADA (těžká imunodeficience)
2. Genová terapie *in vivo* - Tento přístup využívá buňky přímo se vyskytující v těle pacienta, z toho důvodu musí být použit pouze vektor, který je přísně specifický pro daný orgán, abychom předešli možné infekci zárodečných buněk. Tohoto bylo využito při léčbě Canavanovi choroby.

V současnosti se aplikují především metody *in vitro* (Lewis, 2015; Rosypal, 2000).

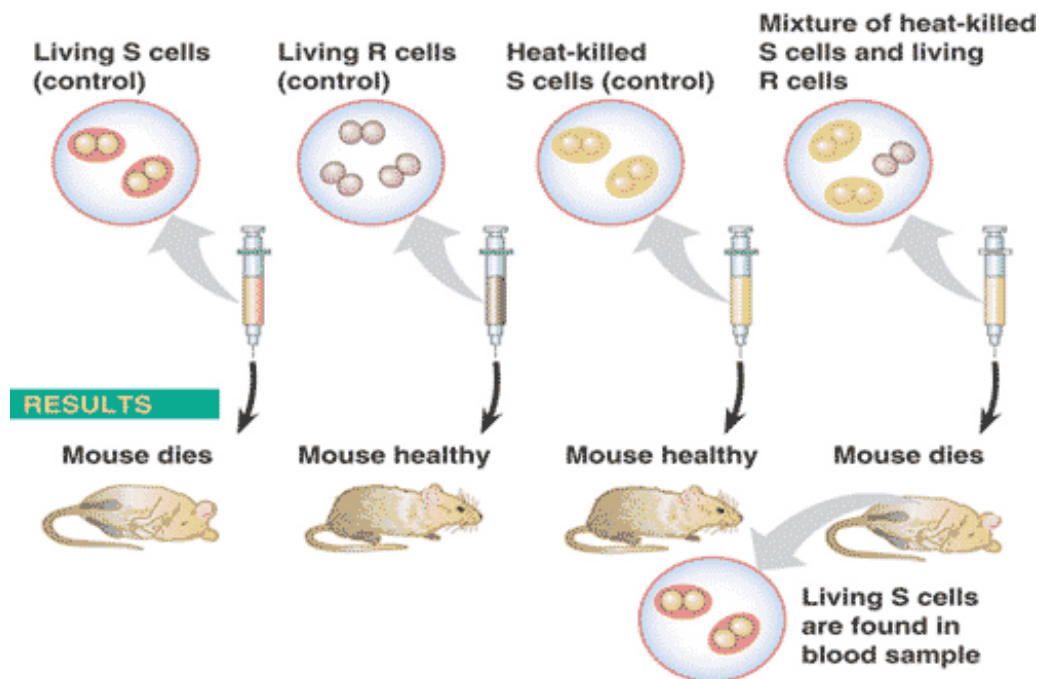
4 NEJVÝZNAMNĚJŠÍ OBJEVY GENOVÉ TERAPIE

4.1 Objasnění transformačního principu

Prvním důležitým milníkem v genové terapii byl rok 1928, kdy britský bakteriolog Frederick Griffith popsal transformační princip ve svém článku, jenž je znám pod označením Griffith's experiment. V této studii kombinoval avirulentní živé bakterie pneumokoka I. typu s usmrcenými virulentními bakteriemi pneumokoka II. typu. Takto vzniklou kombinací pneumokoků infikoval myši. U myši se pneumonie projevila a zemřely, což bylo velmi překvapující. Po izolaci jednotlivých kolonií z krve těchto myši, Griffith došel k závěru, že avirulentní formy pneumokoka byly transformovány do virulentních forem a navíc pneumokok I. typu byl převedený do typu II (Obr 1).

Rok poté Dawson a Sia potvrdili výsledek studie a vynalezli metodu úspěšné transformace *in vitro*. Chvíli na to Dawson zanechal výzkumu a v jeho studii pokračoval James L. Alloway. V experimentu narušil virulentní formu pneumokoka, čímž odstranil vnitrobuněčný obsah. Tímto způsobem připravené buňky přidal na růstovou kulturu avirulentních forem pneumokoka a pozoroval průběh transformace. Zjistil, že „něco“ v buňce bez buněčného extraktu je zodpovědné za transformaci pneumokoků bakterie, ale nevěděl, co to je.

Avery, MacLeod a McCarty soustředili svoje studie na identifikaci látky, která způsobuje transformaci. V roce 1944 demonstrovali, že genetická informace se vyskytuje ve formě DNA, která je zodpovědná za transformaci. Toto poznání molekulárních základů vedlo k dramatickým změnám ve směru dalších studií a DNA se tak dostala do popředí zájmu výzkumů (Wirth, Parker, Ylä-Herttuala, 2013).



Obr. 1. Griffitův experiment, který vedl k objasnění transformačního principu

Zdroj: <https://www.quia.com/jg/1266941list.html>

Transdukcce

Americký genetik a mikrobiolog Joshua Lederberg byl v roce 1958 oceněn Nobelovou cenou za jeho práci na genetice bakterií. Popsal další mechanismus transformace genetické informace bakterií a to konjugaci.

Lederberg společně s N. Zinderem odhalili třetí možný mechanismus transformace, který pojmenovali transdukcce. Provedli experiment, ve kterém od sebe oddělili mutantní salmonelu s rezistencí na léky a divoký typ této formy pomocí skleněného filtru. Zjistili, že i když použili skleněný filtr, k přenosu genetické informace mezi nimi stejně došlo, a to prostřednictvím bakteriofága. Tímto objevem objasnili, jak je možné, že různé druhy bakterií mohou získat odolnost vůči stejným lékům (Wirth, Parker, Ylä-Herttuala, 2013).

4.2 Objevení struktury DNA

V roce 1953 J. D. Watson a F. H. C. Crick popsali strukturu DNA, což vedlo k převrácení chápání toho, jak se v organismech přenáší genetická informace. Za tento objev jim byla v roce 1962 udělena Nobelova cena za medicínu. Společně s nimi byl oceněn M. H. F. Wilkins (Cox et al., 2012; MLA, 2014).

Ve své publikaci DNA popsali jako dlouhou vláknitou strukturu, která se skládá ze dvou polynukleotidových řetězců, přičemž každý z řetězců je tvořen několika nukleotidy. Každý nukleotid obsahuje cukernou složku, fosfátovou skupinu a purinovou (adenin, guanin) nebo pyrimidinovou (cytosin, thymin) bázi. Dva řetězce jsou mezi sebou spojeny vodíkovými můstky, které vznikají mezi komplementárními bázemi. Řetězce DNA se dále stáčí okolo své osy, většina typů DNA je pravotočivá (Cox et al., 2012; Watson, Crick, 1953).

Mimo jiné Crick následně zavedl pojem centrální dogma molekulární biologie, které popisuje, jakým směrem proudí genetická informace v buňce. Jeho pojetí zahrnovalo přenos informace z DNA do RNA a následnou translaci RNA do proteinů. Kromě toho i syntézu vlastních řetězců DNA, tedy přenos z DNA do DNA (Cox et al., 2012).

4.3 Počátky genové terapie

Několik let poté, co byl objeven a prezentován proces transdukce, experiment Howarda Temina s buňkami kuřat poukázal na to, že přenos genetické informace probíhá nejen z DNA do RNA, ale i obráceně. V důsledku tohoto zjištění byly objeveny první RNA dependentní DNA polymerázy.

Dalším důležitým přínosem bylo odhalení vlastnosti virů, která by mohla být velmi užitečná při přenosu genů do cílových buněk. Genové inženýrství se stalo potenciální možností, jak ozdravovat pacienty s geneticky podmíněným onemocněním, která se předtím zdály jako neléčitelná.

Edward Tatum v roce 1966 publikoval článek, ve kterém poukazoval na účinky některých virů, jenž by po odstranění genů způsobujících patogenitu z jejich genomu mohly být využity v genové terapii. Odstraněné geny by se nahradily geny terapeutickými. Bohužel v této době nebyly k dispozici takové technologie, které by to umožnily.

Pár let nato se Rogers a další pokusili léčit dvě dívky s poruchou cyklu močoviny. Pro tyto účely byla využita divoká forma viru *Shope papilloma*, která měla do genomu dívek začlenit funkční gen pro enzym arginázu. Výsledky byly bohužel negativní a později se navíc přišlo na to, že *Shope papiloma* tento enzym nekóduje (Wirth et al., 2013).

Martin Cline po úspěšných experimentech na myších provedl v roce 1980 první genovou terapii za použití rekombinantní DNA u lidí, nicméně tak učinil bez povolení od UCLA Institutional Review Board (Wirth et al., 2013; Sheridan, 2011).

První oficiálně povolená léčba s využitím rekombinantní DNA byla tedy provedena až S. A. Rosenbergem. Léčba byla schválená v prosinci roku 1988 a byla použita u pěti pacientů s již pokročilým melanomem. Dva z těchto pacientů zemřeli do jednoho roku. U jedné pacientky došlo ke kompletnímu ústupu melanomu, který pokračoval i jedenáct měsíců od provedení léčby. Další pacient měl více než 90% smrštění metastází v uzlinách, nicméně v intramuskulární hmotě nedošlo k žádné změně. U posledního pacienta byl zaznamenán ústup, který trval asi 2 měsíce, poté znovu došlo k růstu nádoru (Rosenberg et al., 1990; Wirth et al., 2013).

Další genová terapie provedená na člověku proběhla v roce 1990. Léčbě se podrobily dvě pacientky s deficiencí adenozyndeaminázy, která způsobuje nefunkčnost imunitního systému. Jedná se o velmi vzácné autozomálně přenášené onemocnění. Choroba způsobuje, že se v těle nevytváří enzym adenozyndeamináza, čímž se sníží rychlost syntézy řetězce DNA, proto nemohou T-lymfocyty proliferovat a B-lymfocyty jsou schopny tvořit jen malé množství protilátek. Léčba byla úspěšná, jelikož se u obou pacientek zlepšila funkce imunitního systému, proto má velký potenciál pro využití i u pacientů, kteří trpí závažnou formou tohoto onemocnění (Rosypal, 2000; Snustad, Simmons, 2009).

5 HLAVNÍ VEKTORY PRO GENOVOU TERAPII

Pro přenos funkční kopie genu do buňky s jeho nefunkční formou, se v genové terapii využívají vektory. Vektory můžeme rozdělit do dvou základních kategorií - virové a neviróvé, přičemž každá z těchto kategorií může být dále členěna do několika podskupin.

5.1 Virové vektory

Tyto typy vektorů, ačkoli představují určitá rizika, jsou vysoce účinné v přenosu genů. Virové vektory využívají k tomuto přenosu proces zvaný transdukce (Cotrim, Baum, 2008). Kvůli své specifitě jsou využívány častěji než neviróvé vektory.

Pro tvorbu všech virových vektorů je nezbytné odstranit většinu genů z genomu viru, zejména potom ty geny, které by mohly potenciálně způsobit infekci. Takto odstraněné geny jsou poté nahrazeny geny terapeutickými včetně genu našeho zájmu (Giacca, Zacchigna, 2012).

Tyto vektory jsou jedním z nejslibnějších objevů pro využití v genové terapii. Jedná se o jednoduché organismy s poměrně malou velikostí genomu, který se dá upravit, čehož se využívá právě v genové terapii (Lukashev, Zamyatnin, 2016).

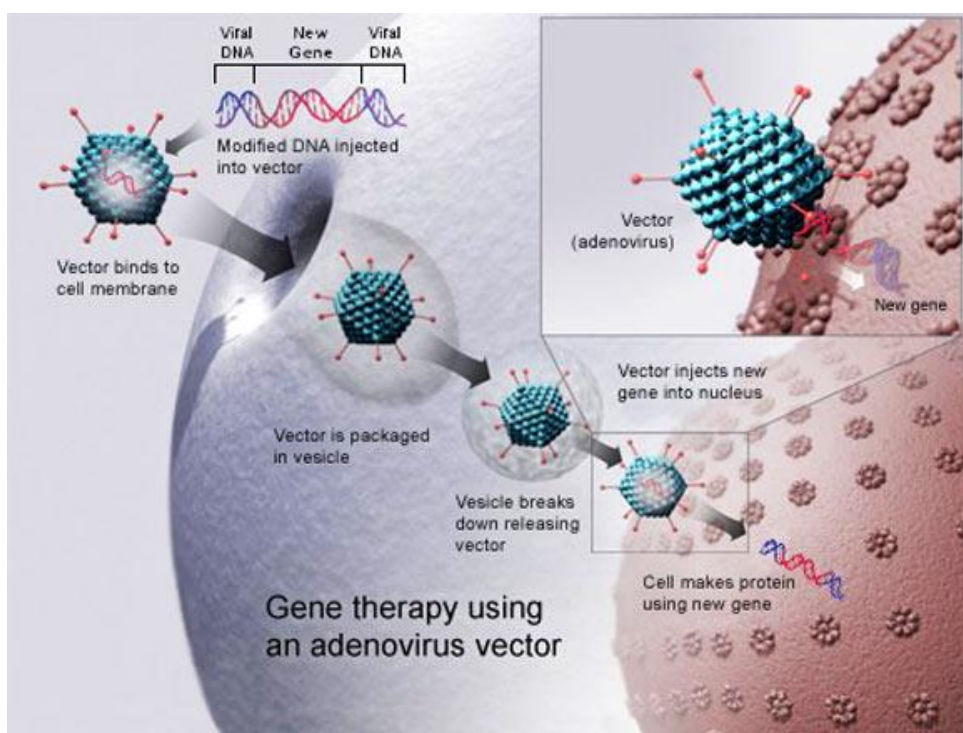
5.1.1 Adenoviry

Poprvé byly izolovány v 50. letech 20. století a to z lidské tkáně (Douglas, 2007). Studium těchto virů začalo před více než 20 lety a jedná se o vůbec první viry, které se začaly zkoumat ve spojitosti s genovou terapií (Lukashev, Zamyatnin, 2016).

Adenoviry se řadí do rodiny virů *Adenoviridae*, která se dále člení na dva rody. První z nich je *Aviadenovirus genus*, tento rod je schopný infikovat pouze ptáky, na rozdíl od *Mastadenovirus genus*, jenž může infikovat celou řadu savců. Adenoviry schopné napadnout člověka jsou rozděleny do šesti druhů (A – F), přičemž jednotlivé druhy se od sebe liší procentuálním zastoupením G - C párů v molekule DNA (Douglas, 2007).

Adenoviry jsou neobalené viry s lineární dvou- řetězcovou DNA. Jejich genom je velký přibližně 35 kb. Před použitím adenovirů, stejně jako u všech dalších virových vektorů, je nezbytné odstranit část jejich genomu, která by mohla způsobit následnou infekci a nahradit ji terapeutickým genem (Obr. 2). Podle počtu odstraněných genů

rozlišujeme různé druhy adenovirových vektorů. Nejpoužívanější z nich jsou označovány jako první generace vektorů a mají z genomu odstraněn *E1B* gen. Odstraněním této oblasti genomu se docílí toho, že nemohou být exprimovány *E2* geny, čímž se blokuje virová replikace DNA. Dále bývá také často odstraněna oblast *E3*, která není nutná pro následnou replikaci. Po takovém odstranění různého počtu genů z virového genomu, můžeme získat celkovou kapacitu vektoru až 7,5 kb pro vložení požadované cizorodé DNA (Douglas, 2007).



Obr. 2.: Schéma použití adenovirových vektorů v genové terapii.

Zdroj: <http://www.sci-news.com/medicine/science-retooling-human-gene-therapy-new-adenoviral-vectors-02109.html>

Jednou z hlavních nevýhod použití adenovirových vektorů je, že jejich virové komponenty se mohou nespecificky vázat na krevní složky, čímž následně dochází k inaktivaci viru. Mezi další nevýhody patří to, že jejich velké dávky mohou vyvolat silnou imunitní odpověď organismu, která v některých velmi extrémních případech může dokonce skončit i smrtí. Většina dospělých má navíc proti nejběžnějším adenovirům typu C5 protilátky, tudíž by jejich použití nemělo žádný efekt (Zamyatnin, 2016).

I přes zmíněné nevýhody by se adenoviry daly použít pro léčbu několika geneticky podmíněných onemocnění, zejména tam kde je imunitní odpověď žádoucí. Takovými

onemocněními mohou být například rakovina, ischemická choroba srdeční. Potenciální využití adenovirových vektorů by mohlo být také v oblasti vývoje vakcín, které by se následně mohly dát využít i pro léčbu získaných virových onemocnění jako je například HIV nebo EBOLA. Nicméně se v současnosti od používání adenovirových vektorů upustilo, kvůli jejich značné komplexitě, poměrně velké velikosti genomu a jejich vedlejším účinkům (Lukashev, Zamyatnin, 2016; Douglas 2007).

5.1.2 Adenoasociované viry

Adenoasociované viry jsou jedny z nejmenších neobalených virů, které řadíme do rodu *Dependovirus* z rodiny virů *Parvovirus* (Balakrishan, Jayandharan, 2014). Jedná se o neautonomní organismy, nemohou se tedy samostatně replikovat (Lukashev, Zamyatnin, 2016). V současné době nebylo této skupině virů přiřazené žádné onemocnění, které by způsobovali člověku (Coura, Nardi, 2008).

Jedná se o viry s velikostí genomu přibližně 4,7 kb s jednořetězcovou molekulou DNA (Ortiz, Schaffer, 2016). Genom se skládá ze dvou otevřených čtecích rámců, které jsou obklopené koncovými repeticemi (*ITR*). *ITR* je tvořeno palindromickými sekvencemi, které vytváří strukturu vlásenky s volnou hydroxylovou skupinou na 3' konci (Balakrishan, Jayandharan, 2014). *ITR* zastává u viru důležitou roli, neboť představuje počátek replikace, reguluje genovou expresi divokého typu AAV a další (Coura, Nardi, 2008).

Dva otevřené čtecí rámce představují sekvence pro kódování dvou genů a to *rep* a *cap*. Sekvence pro *rep* kóduje čtyři základní proteiny. *Rep 78* a *Rep 68* jsou důležité pro replikaci viru, kontrolu transkripce, mohou ovlivňovat genovou expresi AAV a také mají endonukleázovou, ATPázovou a helikázovou aktivitu. *Rep 52* a *Rep 40* jsou potřebné pro balení genomu. *Cap* sekvence kóduje tři proteiny – *VP1*, *VP2*, *VP*, u kterých se předpokládá, že jsou potřebné pro cestu AAV genomu do jádra (Coura, Nardi, 2008).

Tvorba virového vektoru je poměrně náročná a spočívá v odstranění obou čtecích rámců, místo nichž je vložena požadovaná sekvence DNA. Transgen je poté obklopen repetitivně sekvencí *ITR*, která zastává všechny potřebné funkce (Coura, Nardi, 2008).

Hlavními nevýhodami těchto typů vektorů je jejich příliš malá kapacita, náročnost přípravy a pomalý nástup exprese požadovaného genu. Naopak mezi výhody patří jejich dlouhodobá exprese transgenu, odolnost vůči změnám pH a teploty, jsou nepatogenní

a nevyvolávají imunitní odpověď a po vložení transgenu do jejich genomu zůstává jen velmi malé procento z původní virové DNA, což zajišťuje vysokou bezpečnost pro používání těchto vektorů u lidí (Coura, Nardi, 2007). Divoká forma AVV se váže specificky do místa na 19. lidském chromosomu, díky čemuž nedochází k nesprávnému začlenění transgenu v organismu (Coura, Nardi, 2008).

Potencionální využití těchto vektorů existuje pro řadu lidských onemocnění, jako je například hemofilie, cystická fibróza, svalová dystrofie, některé oční, neurologické a srdeční onemocnění a v neposlední řadě rakovina (Coura, Nardi, 2007). AAV vektory se díky svým značným výhodám staly jedním z nejslibnějších vektorů, které se používají pro genovou terapii u lidí (Balakrishnan, Jayandharan, 2014).

5.1.3 Retroviry

Retroviry jsou obalené RNA viry patřící do rodiny virů *Retroviridae* (Vargas et al., 2016). Vývoj vektorů odvozených od těchto virů započal před více než třiceti lety (Blo et al., 2007). První klinický pokus za použití retrovirových vektorů byl proveden v devadesátých letech minulého století a jednalo se o léčbu kombinované imunodeficiency (Lukashev, Zamyatnin, 2016).

Členy rodiny *Retroviridae* jsou jednořetězcové RNA viry, které k napadení hostitelské buňky musí nejdříve využít reverzní transkripci k přepsání své genetické informace z RNA do DNA (Escors, Breckpot, 2010). Pro genovou terapii se používají zejména viry odvozené od leukémie u myši – onkogenní viry a viry způsobující u lidí HIV – lentiviry (Vargas et al., 2016).

Genom těchto virů se skládá ze tří otevřených čtecích rámců, tvořených geny – *gag*, *pol* a *env*, které jsou obklopeny dvěma repetitivními sekvencemi a je velký přibližně 7 až 12 kb. *Gag* gen je nezbytný pro kódování strukturních proteinů, *pol* pro enzymy a *env* gen je důležitý pro tvorbu virového obalu (Escors, Breckpot, 2010; Vargas et al., 2016).

Mezi hlavní výhody vektorů odvozených od onkogenních virů patří to, že nevyvolávají imunitní odpověď organismu a v případě, že se podaří je začlenit do hostitelského genomu je exprese požadovaného genu stálá. Přesto mají tyto vektory také řadu nevýhod, mezi něž patří zejména neschopnost začlenit se do jiných než dělicích se buněk a navíc mohou způsobit vznik inzerční mutageneze, která může mít za následek

aktivaci proontogenu a vznik nádoru. Za cílem předejít těmto nevýhodám, byly vyvinuty vektory odvozené od lentivirů (Escors, Breckpot, 2010; Svoboda 2011).

5.1.4 Lentiviry

Jak již bylo zmíněno výše, lentiviry jsou jedny z nejvyužívanějších vektorů pro genovou terapii ze skupiny retrovirů. Lentiviry jsou odvozeny od viru způsobujícího u lidí závažné onemocnění imunodeficiencie známého jako HIV. Poprvé byly objeveny před více než sedmi miliony let v králičím genomu a pro klinické účely se využívají přes deset let (Rothe et al., 2013; Sauer et al., 2014). První vektor odvozený od lentivirů byl získán z HIV-1, který je stále jedním z nejvyužívanějších systémů tohoto typu vektorů (Pfeifer et al., 2010).

Jejich hlavní výhoda oproti klasickým onkogenním virům spočívá v tom, že se dokáží začlenit i do nedělících se buněk (Bainbridge, et al., 2001). Ačkoli lentivirové vektory mohou také způsobovat inserční mutagenese, zdají se být mnohem méně mutagenní než ostatní retroviry (Escors, Breckpot, 2010).

Kvůli svým značným výhodám oproti dalším retrovirům se tyto vektory dají uplatnit pro léčbu řady onemocnění, jako jsou například rakovina, neurologické poruchy, metabolické defekty, oční vady a v neposlední řadě jsou potenciálním nástrojem právě pro léčbu HIV (Sauer, et al., 2014; Escors, Breckpot, 2010; Rothe et al., 2013).

5.2 Nevirové vektory

Nevirové vektory se používají v mnohem menší míře než virové, zejména kvůli jejich nízké účinnosti. Naproti tomu ale nabízí různé výhody jako je bezpečnost, snadná příprava a možnost přenášet i větší terapeutické geny (Wang et al., 2013). Využívají se zejména k přenosu molekul DNA, které mohou být transferovány pomocí plasmidu, nebo se může přenášet jen nahá nukleová kyselina. Nevirové vektory jsou dále schopné transportu i RNA, což ale není tak časté (Ramamoorth, 2015).

Při přenosu DNA pomocí nevirálních vektorů je potřeba počítat s určitými zásadními překážkami, jako je možná degradace molekuly endonukleázami, průchod přes plazmatickou a následně i jadernou membránu a podobně (Wang et al., 2013; Hao et al., 2014).

5.2.1 Fyzikální metody

Fyzikální metody v genové terapii jsou velice rozmanité, z toho důvodu jsou zde popsány jen vybrané z nich.

Mikroinjekce

Tato technika patří k jedné z neúčinnějších přímých metod, co se týká nevirového přenosu plasmidové DNA do jádra (Pathak et al., 2009). Genetický materiál je přenášen pomocí jehly o průměru 0,5-5 μm , která se snadno dostane do buňky i jádra, kde je poté nukleová kyselina vypuštěna.

Jedná se o velmi jednoduchou, efektivní a bezpečnou metodu pro genovou terapii, která dokáže přenášet i velké molekuly DNA. Díky své jednoduchosti v manipulaci s jedinou buňkou však není vhodná pro onemocnění, kde je potřeba terapeutický gen importovat do více buněk najednou. Největší potenciál má mikroinjekce pro vakcinaci, kde je žádoucí vznik lehké imunitní odpovědi (Wang et al., 2013).

Elektroporace

Elektroporace je fyzikální metoda, která pro vstup DNA do buňky využívá zdroj napětí. Pomocí série krátkých elektrických impulsů v řádu milisekund se dočasně depolarizuje plazmatická membrána, což umožňuje chvilkovou propustnost membrány pro větší molekuly (Sullivan, 2010). Průchod membránou probíhá prostřednictvím pórů vzniklých v důsledku elektrického napětí, jenž na povrchu buňky zůstávají přibližně po dobu 10 nanosekund. Pokud jsou póry poté znovu zaceleny, jedná se o reverzibilní proces a buňka může dále žít, v opačném případě, kdy je tento proces nevratný dochází k buněčné smrti. Ireversibilního procesu se využívá k ničení nádorových buněk a tím léčbě rakoviny (Ramamoorth, 2015).

Účinnost elektroporace závisí na řadě okolností, jako jsou například koncentrace DNA, typ DNA, době intervalů mezi jednotlivými impulsy, intenzitě elektrického proudu atd. Využití této bezpečné a efektivní metody je možné pro všechny typy buněk, navíc je tímto způsobem možno transferovat nukleové kyseliny o velikosti až 150 kb (Wang et al., 2013).

Sonoporace

Jedná se o metodu podobnou elektroporaci, která využívá vysoké frekvence ultrazvukových vln (Sullivan, 2010). Tato neinvazivní metoda dočasně zvyšuje propustnost buněčné membrány pomocí ultrazvuku, čímž umožňuje DNA vstup do buňky (Ramamoorth, 2015; Pathak et al., 2009).

Aplikace sonoporace se uplatňuje zejména u srdeční tkáně, svalů, mozku a ledvin (Ramamoorth, 2015). Mezi hlavní výhody patří bezpečnost metody a možnost opravy buněk vnitřních orgánů bez chirurgického zákroku, největší nevýhodou nicméně stále zůstává nízká účinnost. Účinnost této techniky se dá zvýšit použitím kontrastní látky, modifikací membrány za pomoci tepla, nebo aplikací komplexu DNA s kationovými lipidy, namísto nahé DNA (Wang et al., 2013).

5.2.2 Chemické metody

Kationtové lipidy

Jedná se o jednu z nejpoužívanějších metod pro genovou terapii z řady nevirálních vektorů s typickou strukturou, která se skládá z pozitivně nabitých hydrofilních hlav, jež je spojena s hydrofobním koncem. Pozitivně nabitá skupina potom umožňuje navázání fosfátové skupiny vybrané nukleové kyseliny a tím vytvoření struktury zvané lipoplex (Hao et al, 2014; Ramamoorth, 2015). Tento komplex je vytvářen díky elektrostatickým silám mezi kationtovým lipidem a aniontovou molekulou DNA (Pathak et al., 2009).

Kationtové lipidy se mohou použít buď samostatně, nebo současně s kolipidem. Mezi nejpoužívanější kolipidy patří cholesterol a DOPE. Přesto, že jsou tyto lipidy intenzivně studovány a využívány, jejich mechanismus, kterým uskutečňují přenos genů, zatím není zcela znám. Mezi jejich výhody řadíme jednoduchou přípravu a nízké náklady. Nevýhodou může být jejich toxicita a nízká účinnost přenosu, jež závisí na struktuře lipidu, velikosti lipoplexu, poměru náboje lipidu s DNA, typu buňky a podobně (Wang et al., 2013).

Kationtové polymery

Kationtové polymery se podobají kationtovým lipidům v obsahu kationtové struktury, která váže DNA (Sullivan, 2010). Komplexy polymeru s DNA se nazývají polyplexy a jsou více stabilní než lipoplexy. Vektory na bázi polymerů můžeme dále

rozlišovat podle toho, zda se jedná o přirozené nebo syntetické polymery (Ramamoorth, 2015).

Polyetyleniminy (PEI)

Jedná se o syntetický polymer, který je jedním z neúčinnějších polymerů pro genový transport vůbec. Dokáže chránit molekulu DNA před degradací a navíc usnadňuje DNA endosomální únik. Bylo prokázáno, že molekulová hmotnost PEI ovlivňuje genový přenos, přesněji, že se zvyšující se hmotností, se zvyšuje účinnost přenosu, nicméně i toxicita (Ramamoorth, 2015; Wang et al., 2013).

Poly-L-lysin (PLL)

Tento syntetický polymer se skládá pouze z primárních aminů, v důsledku čehož může být jeho struktura snadno upravována. Patří k prvním polymerům, které byly využity pro přenos genů, nicméně jeho účinnost je nízká. Studie ukazují, že polyplexy složené s DNA a PLL, které jsou menší, mají vyšší toxicitu, nejspíš kvůli vysoké hustotě náboje na vysokou molekulovou hmotnost (Wang et al., 2013; Pathak et al., 2009).

Chitosan

Zástupce přírodních polymerů, odvozený od polysacharidu. Jeho největší výhoda spočívá v tom, že je netoxický i ve vysokých koncentracích (Ramamoorth, 2015). Nicméně v porovnání s ostatními uvedenými polymery má nižší účinnost. Má široké uplatnění ve farmaceutickém průmyslu (Pathak et al., 2009).

6 METODY GENOVÉ TERAPIE

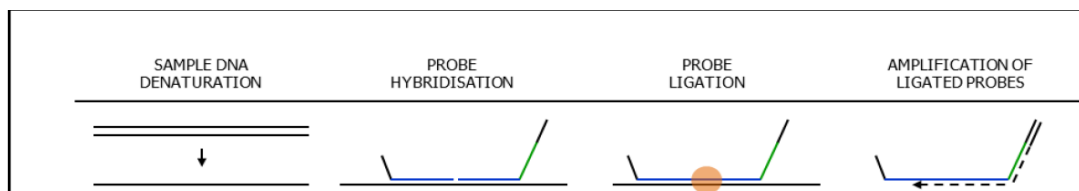
Metody genové terapie se zaměřují na odhalení změn a mutací v genomu jedince. K pozorování těchto odchylek byly vyvinuty různé metody, přičemž mezi nejznámější patří právě tyto čtyři zmíněné níže.

6.1 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

MLPA je jedna z nejpoužívanějších metod v molekulární diagnostice. Jedná se o metodu na principu PCR, která dokáže odhalit duplikace nebo delece v genomu (Stuppia et al., 2012).

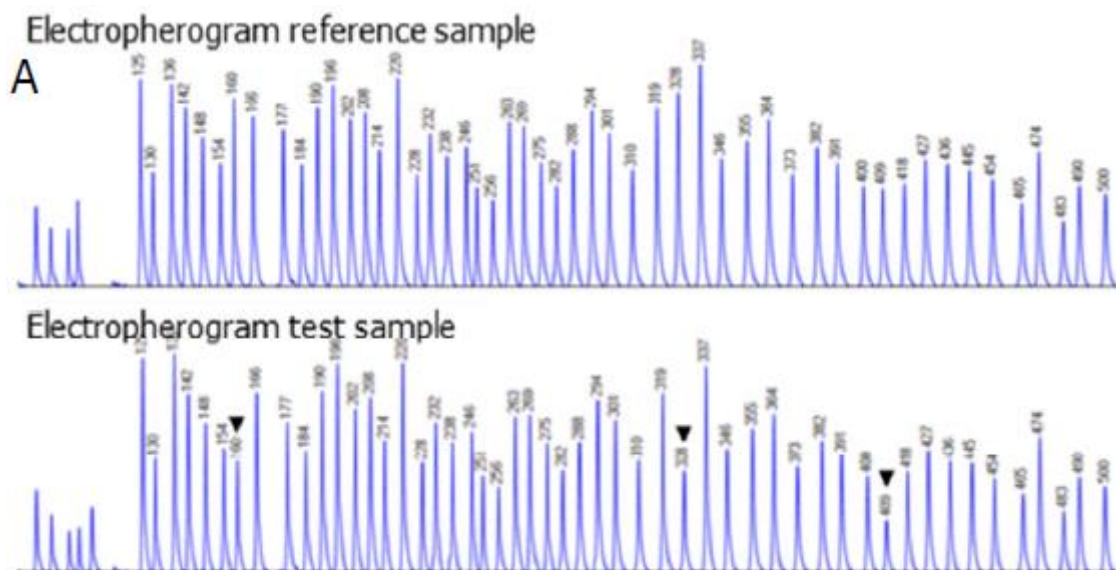
Princip spočívá v amplifikaci za využití více sond, kdy každá nese specifickou sekvenci komplementární k určité části vzorku DNA. Každá sonda je tvořena dvěma oligonukleotidy a po hybridizaci dochází u dvou sousedních sond k ligaci za vzniku jedné sondy (Obr. 3). Aby mohlo dojít k hybridizaci je nejprve nutné vzorek DNA denaturovat a poté přidat ke směsi sond po dobu asi 16 hodin. Po úspěšné hybridizaci je možné přejít k PCR reakci za použití pouze jednoho páru primerů, čímž se docílí toho, že všechny sondy jsou amplifikovány tímto stejným párem (Biogen; Hömig-Hölzel, Savola, 2012).

Po PCR reakci následuje použití elektroforézy, která separuje amplifikované produkty reakce podle jejich délky. K vyhodnocení se používá elektroferogram, kde se porovnávají získané hodnoty s referenčními vzorky. Delece v genomu se projeví v elektroferogramu sníženým píkem oproti referenčním hodnotám, zatímco duplikace jeho zvýšením (Obr. 4.) (Biogen).



Obr. 3.: Princip MLPA technologie

Zdroj: http://www.biogen.cz/editor/filestore/Image/MLPA/obrazek1_119_x_680.png



Obr. 4.: Porovnání elektroferogramů testovaného a referenčního vzorku

Zdroj: http://www.biogen.cz/editor/filestore/Image/MLPA/obr_2.png

6.2 MAPH (Multiplex amplification and probe hybridization)

MAPH je další velmi využívaná metoda k detekci změn počtu bází, podobná MLPA technice. Hybridizace sondami probíhá na membráně, kde je fixovaná genomová DNA. Po hybridizaci následuje důkladné promytí membrány, při kterém se odstraní nenavázané sondy. Sondy pro metodu MAPH jsou vytvářeny pomocí klonování ve vektorech, do kterých jsou vloženy malé fragmenty vybrané sekvence DNA. Navázané sondy jsou dále podrobeny amplifikaci s pouze jedním specifickým párem primerů. Po PCR reakci následuje stejně jako u MLPA separace pomocí elektroforézy a vyhodnocení pomocí elektroferogramů, přičemž výška každého píku je přímo úměrná počtu kopií v genomu (Sellner, Taylor, 2004; Stefan et al., 2004).

Přestože MAPH a MLPA představují dvě velmi podobné metody, můžeme u nich pozorovat odlišné výhody a nevýhody. Sondy využívané pro MAPH se dají snadněji generovat, zatímco u MLPA je menší riziko kontaminace. Další výhodou MLPA je množství DNA potřebné pro testování. U MLPA se uvádí za dostačující již 20 ng, nicméně pro spolehlivější výsledky je více vyhovující množství 100-200 ng, oproti tomu pro MAPH je nutné použít 1 mg DNA (Sellner, Taylor, 2004).

6.3 qPCR (Real time PCR)

Jedná se o klasickou PCR metodu s tím zlepšením, že umožňuje sledovat množství produktu po každém cyklu, tedy v reálném čase, díky fluorescenčním signálům. Jako u běžné PCR, i zde dochází k několikanásobnému opakování tří základních fází reakce, což jsou denaturace molekuly DNA, nasednutí primerů a následná syntéza řetězce pomocí termostabilní polymerázy. Z hlediska teorie by se po každém cyklu měl počet molekul DNA v reakci zdvojnásobit, prakticky však výtěžek bývá nižší.

Průběh reakce můžeme rozlišit do tří stádií. Prvním z nich je exponenciální fáze, která probíhá na začátku reakce, kdy je dostatek všech potřebných komponent pro syntézu nových řetězců DNA a účinnost reakce může být skutečně až 100%, z čehož vyplývá, že po každém cyklu se počet molekul vybraných sekvencí přesně zdvojnásobí. Poté následuje lineární fáze, při níž už se množství produktu nezdvójnásobuje, zejména kvůli pomalému vyčerpávání složek reakce. Posledním stadiem je fáze plató, ve které už jsou spotřebovány všechny komponenty pro syntézu nových řetězců, a produkt již dále nepřibývá.

Pro monitorování průběhu reakce se využívají, jak už bylo zmíněno výše, fluorescenční sondy. Ty můžeme rozdělit buď na nespecifické, nebo specifické. Mezi nejběžnější ze skupiny nespecifických sond patří barvivo SYBR Green, které se dokáže vázat k jakékoliv molekule DNA a je poměrně málo nákladné, nicméně jeho největší nevýhodou je, že může vyvolat i falešně pozitivní signály. *TaqMan* sondy patří do skupiny specifických, to znamená, že produkuje signál až po hybridizaci se specifickou sekvencí DNA, takže nedochází k falešně pozitivním signálům, ale naopak je jejich použití poměrně nákladné a obtížné (Pestana et al., 2010; Fraga et al., 2008).

6.4 Sekvenování

Jedná se o nejvhodnější metodu, co se týče molekulární diagnostiky, neboť je schopna v genomu jedince odhalit jak duplikace a delece, tak i substituce. Ve většině případů je vstupním materiálem DNA, ale v současné době je již možné sekvenovat i RNA molekuly. Můžeme rozlišit metody první, druhé a třetí generace.

Metody první generace jsou odvozeny od Sangerova sekvenování, které vzniklo v roce 1975 a neustále se zlepšuje. Hlavní nevýhodou je zejména časová náročnost a malé množství vzorku, jež můžeme analyzovat. S cílem vyvarovat se těmto nevýhodám byly

vyvinuty metody druhé generace, které dokáží za nižší náklady zpracovat mnohem větší množství dat, bohužel však s vyšší chybovostí. Nejznámější technikou pro druhou generaci je pyrosekvenování. Jako metody třetí generace se označují nově vyvíjené metody, které by měly být úspěšnější než metody generace druhé. Většina těchto technik nevyžaduje zastavení procesu mezi dalšími kroky pro detekci. Patří sem například sekvenace pomocí nanopórů, nebo určování pořadí bází za využití pokročilých mikroskopických technik, při kterých jsou jednotlivé molekuly DNA zobrazeny přímo. Limitací dnešních metod zůstává neschopnost extrahovat kompletní genom, jelikož jsme schopni číst pouze po malých částech DNA (Linnarsson, 2010; Gaplovský, Gaplovská-Kyselá, 2012; Abramova et al., 2016).

7 MODELOVÉ ORGANISMY

Modelové organismy hrají velmi důležitou roli ve vývoji genové terapie, neboť jsou součástí preklinického testování přenosu genů předtím, než je možné uskutečnit tento přenos na člověku (Blagbrough, Zara, 2009). V obecném slova smyslu jsou modelové organismy nelidské druhy, u kterých probíhají intenzivní studie k pochopení zásadních biologických procesů a cest, s cílem je poté aplikovat na vyšší organismy (Ankeny, Leonelli, 2011; Bonini, Berger, 2017).

Mezi nejjednodušší modelové organismy patří: huseníček, octomilka, hlístice nebo i myš. Pro všechny tyto druhy je typický krátký cyklus reprodukce, snadné a finančně nenáročné udržování. Pro genovou terapii je ale výhodnější použít velké zvířecí modely, které jsou člověku mnohem blíže příbuzné. Do těch nejčastěji využívaných řadíme kočky, psi, prasata, koně, ovce a skot (Ankeny, Leonelli, 2010; Wolfe, 2009). Tyto organismy jsou pro studium lidských nemocí výhodnější než jednoduché organismy uvedené výše zejména proto, že jejich velikost a velikost jejich orgánů je porovnatelná s těmi u člověka. Můžeme u nich pozorovat podobný průběh onemocnění, a také žijí mnohem déle, čehož se využívá ke zkoumání dlouhodobých účinků léčby (Casal, Haskins, 2006, Sleeper et al., 2009).

Psí modely jsou právě jedny z nejpoužívanějších pro genovou terapii, neboť více než polovina genetických onemocnění, které se u nich vyskytují, je způsobená stejnými geny jako u člověka. Navíc je jejich velikost často podobná velikosti dítěte a mají tedy potenciální využití i v pediatrii. Jejich další velkou výhodou je podobný imunitní systém tomu, který se vyskytuje u lidí. Využívají se jak pro studium onemocnění, tak pro jejich možné terapie. Napomáhají k objasnění a hledání léčby pro mnoho onemocnění, jako je hemofilie, neoplazie a kardiomyopatie, pro kterou je příkladem vhodného plemene vodní portugalský pes (Sleeper et al., 2009; Blagbrough, Zara, 2009; Casal, Haskins, 2006).

Kočí modely jsou důležité zejména pro studium průběhu a léčby neurologických onemocnění, které využívá toho, že byl kočí mozek již velmi dobře popsán. Navíc jejich mozek a mozek člověka mají velmi podobnou anatomii. Dají se využít například pro objasnění alfa-manosidózy.

Koňské modely se používají zejména pro studium nemocí, které se u nich vyskytují přirozeně. Takovým onemocněním může být třeba osteoartritida. Používají se také pro

vývoj genové terapie pro nádorová onemocnění, která jsou u koní ve věku více než 12 let velmi časté.

Modely skotu jsou vhodné zejména pro studium onemocnění, které se vyskytují hlavně u dětí. Využívají se zejména telata, jejichž váha po narození, která činí přibližně 30 kg, je velmi dobře srovnatelná s váhou dítěte. Nejčastější onemocnění, pro které je vhodné jejich užití je porucha cyklu močoviny zvaná citrulinémie, která se právě vyskytuje u malých dětí (Casal, Haskins, 2006; Blagbrough, Zara, 2009).

Prasečí modely nám dovolují objasnit biologii všech druhů arytmiických onemocnění, a navíc se využívají pro vývoj dalších způsobů přenosu genu, jako je transport pomocí plazmidu. Dále jsou studovány pro možnou aplikaci DNA vakcinace a i pro možnou transplantaci orgánů člověku, neboť jejich orgány jsou velmi podobné těm lidským (Blagbrough, Zara, 2009).

Z velkých zvířecích modelů jsou důležité také modely primátů, protože jsou člověku nejvíce podobné. Také se u nich studuje průběh onemocnění a testování účinnosti nových způsobů léčby. Z primátů se využívá nejčastěji makak, mirikina, kočkodan a podobně. Jejich hlavní aplikace je významná pro objasnění Parkinsonovi choroby, která je druhou nejčastější neurodegenerativní poruchou u lidí. Primáti jsou velmi vhodní pro studium této choroby, neboť stejně jako u člověka se u nich s rostoucím věkem zhoršují jednotlivé symptomy. Jsou dále velmi užiteční pro zkoumání bezpečnosti a účinnosti jednotlivých vektorů před jejich aplikací na člověka (Blagbrough, Zara, 2009; Emborg, 2007).

8 ÚSKALÍ GENOVÉ TERAPIE

Ačkoliv genová terapie může být velmi užitečným nástrojem v léčbě řady onemocnění, kdy jiné možnosti léčení již selhávají, nese její použití i významné problémy, které se týkají zejména technických a etických otázek (Vonka, 2011). Od prvního použití genové terapie u člověka uběhlo více než 25 let, a v průběhu této doby se stalo mnoho důležitých událostí, které buď pozitivně, nebo negativně ovlivnily vývoj genové terapie.

Mezi první velké rány, které genová terapie prodělala, patří smrt osmnáctiletého chlapce v reakci na použití adenovirových vektorů v roce 1999. Následující rok patřil mezi ty úspěšnější, kdy se léčba 10 dětí s těžkou kombinovanou imunodeficiencí za použití retrovirů zdála být úspěšná. Nicméně o dva roky později se u dvou z těchto dětí objevila leukémie, právě v důsledku aplikace retrovirů, které způsobily inzerční mutagenézi. Velký úspěch byl zaznamenán v roce 2006, při léčbě Parkinsonovi choroby za použití AAV vektorů. Léčba byla použita u 12 pacientů. Po třech letech bylo u jednoho z nich pozorováno obrovské zlepšení, a u dalších 9 se podařilo snížit symptomy nemoci až o 37% (Edelstein et al., 2007).

8.1 Technické problémy

Jak již bylo zmíněno výše, mezi nejčastější úskalí genové terapie patří technické problémy. Tyto problémy se týkají zejména potíží při používání vektorů, jelikož se doposud nepodařilo vynalézt ideální vektor, mezi jehož vlastnosti by mělo patřit například snadná příprava, schopnost přenášet i velké geny, neměl by být toxický, ani by neměl způsobovat závažné imunitní odpovědi a podobně.

Cílem je vytvoření vektoru, který by byl stabilní jak vně, tak i uvnitř buňky a dokázal by se snadno začlenit až do jejího jádra. Možnou alternativou, jak toho dosáhnout, je využití nanotechnologií, které by vytvořili vektor o maximální velikosti 100 nm, ve kterém by byla zapouzdřená molekula DNA chráněna před endonukleázami. Další výzvou při tvorbě vektorů je snaha o jejich tkáňovou specifitu, aby se předešlo možným nežádoucím účinkům. Řešením tohoto problému by mohlo být použití promotoru, jehož funkce by byla vázaná na cílovou buňku, nebo úpravou virového genomu, tak aby měl na povrchu specifické receptory.

Velký zájem je v současné době o vektory na bázi modifikovaných bakterií, jejichž úprava genomu by vedla k odstranění patogenity, aniž by ztratily schopnost začlenit se do cílové buňky. Tyto modifikované bakterie by se mohly velmi přiblížit k ideálnímu vektoru díky dosažení dlouhodobé exprese požadovaného genu, velké kapacitě pro tento gen a levnější přípravě. Další důležitou výhodou je možnost jejich následné regulace po začlenění do genomu pacienta pomocí antibiotik (Vonka, 2011).

8.2 Etické problémy

Mezi největší etické problémy genové terapie patří kompromis mezi jejími úspěchy a možným nebezpečím. Možné rizika spočívají i v tom, že i když je léčba úspěšná na zvířecích modelech, nemusí být vždy přínosná i pro člověka. Právě z etických důvodů není povoleno použít genovou terapii na zárodečné buňky i přesto, že by se tak dalo dosáhnout celkového odstranění daného onemocnění.

V důsledku etických problémů se objevuje řada otázek. Pomocí průzkumů se ukázalo, že většina lidí souhlasí s genovou terapií, pokud se jedná o velmi závažná onemocnění. Otázkou však zůstává, jaká onemocnění můžeme považovat za velmi závažná. Velké pochybnosti se objevují u možnosti léčení mozkových poruch, kdy většina respondentů buď nesouhlasí, nebo neví, zda by se jednalo o přínos.

Dalším velkým úskalím je léčba dětí, pro jejichž rodiče je nesmírně těžké rozhodnout, zda nechají své dítě podstoupit takový způsob léčby. Důležitou otázkou dále zůstává, zda by se genová terapie měla opravdu používat až jako poslední možnost léčby, protože v některých případech platí, že čím dříve je léčba zahájena, tím lepší potom mohou být výsledky, což souvisí právě s rozhodnutím zahájení léčení u malých dětí.

Veřejnost se často obává, že je příliš nebezpečné měnit něčí geny a poukazuje na to, že si lidstvo „hraje na Boha“. Přínosným poznatkem je zjištění, že názor na genovou terapii nebývá moc často ovlivněn náboženstvím jedince. V současné době je pro genovou terapii důležité snížit možná nebezpečí na minimum, aby byla blíže k možnému běžnému používání (Nancy, Cohen-Haguenauer, 2008; Robillard et al, 2014; Ashcroft, 2004).

V neposlední řadě představuje velký problém genové terapie její ekonomická náročnost. Z čehož vyplývá, že musí být vědecké výzkumy sponzorovány, což s sebou může nést určitá rizika, jako je například střet zájmů (Górecki, 2001).

9 ZÁVĚR

Jedním z hlavních cílů této bakalářské práce bylo popsat genovou terapii, její rozdělení a využití. Obecnou charakterizaci s jejím základním rozdělením jsem se zabývala hned v první kapitole, zatímco využití genové terapie pro jednotlivá onemocnění jsem uvedla v souhrnu informací o nejčastěji používaných vektorech, jejichž popis byl také jedním z cílů. Dále jsem měla objasnit jednotlivé metody využívané v genové terapii, podat základní informace o modelových organismech a nakonec zohlednit etické aspekty, které souvisejí s používáním genové terapie. Těmito cíli jsem se zabývala vždy v jednotlivých kapitolách mé práce.

Od vzniku genové terapie uběhlo již několik let a došlo u ní k velkému pokroku. Genová terapie byla původně vyvinuta z důvodu její aplikace na geneticky podmíněná onemocnění, nicméně v současné době probíhají další výzkumy pro její možné využití i u nemocí, které člověk může získat v průběhu svého života. Takovými onemocněními mohou být například kardiovaskulární choroby nebo HIV. Z obecného hlediska je přesto však nejvíce studovaným onemocněním pro použití genové terapie nadále rakovina. I přes velký pokrok, k němuž došlo v oblasti genové terapie je v současné době klíčové zaměřit se na bezpečnost její aplikace, jelikož s sebou její použití stále nese mnoho velkých rizik. Tato rizika jsou nejčastěji spojena s aplikací virových vektorů, proto nadále probíhají snahy o nalezení ideálního vektoru, který by spojoval efektivitu virového vektoru, ale zároveň by byl i bezpečně aplikovatelný. V současné době se vědci také zaměřují na způsoby editace genomu, které by nevyžadovaly použití nosičů. Jedná se zejména o CRISPR/Cas systémy, jež jsou součástí imunitního systému bakterií.

Pokud by se podařilo odstranit rizika způsobená nízkou bezpečností, mohla by být genová terapie v budoucnu běžnou součástí moderní medicíny a mohla by tak být použita při léčbě onemocnění, které se doposud vyléčit nepodařilo.

10 POUŽITÁ LITERATURA

ABRAMOVA, Veronika, Bruno CABRAL a Jorge BERNARDINO. DNA Analysis: Principles and Sequencing Algorithms. In: *Proceedings of the 8th International Joint Conference on Computational Intelligence*, SCITEPRESS - Science and Technology Publications, 2016-11-9, s. 245-250. DOI: 10.5220/0006084102450250. ISBN 978-989-758-201-1.

ANKENY, Rachel A. a Sabina LEONELLI. What's so special about model organisms? *Studies in History and Philosophy of Science Part A*, 2011, 42(2), 313-323. DOI: 10.1016/j.shpsa.2010.11.039. ISSN 00393681.

ASHCROFT, Richard E. Gene therapy in the clinic: whose risks? *Trends in Biotechnology*, 2004, 22(11), 560-563. DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.09.007. ISSN 01677799.

BAINBRIDGE, JWB, C STEPHENS, K PARSLEY, C DEMAISON, A HALFYARD, AJ THRASHER a RR ALI. In vivo gene transfer to the mouse eye using an HIV-based lentiviral vector; efficient long-term transduction of corneal endothelium and retinal pigment epithelium. *Gene Therapy*. 8(21), 1665-1668. DOI: 10.1038/sj.gt.3301574. ISSN 09697128.

BALAKRISHNAN, Balaji a Giridhara JAYANDHARAN. Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 2014, 14(2), 86-100. DOI: 10.2174/1566523214666140302193709. ISSN 15665232.

BLAGBROUGH, Ian S. a Chiara ZARA. Animal Models for Target Diseases in Gene Therapy — using DNA and siRNA Delivery Strategies. *Pharmaceutical Research*, 2009, 26(1), 1-18. DOI: 10.1007/s11095-008-9646-8. ISSN 0724-8741.

BLØ, Magnus, David R MICKLEM a James B LORENS. Drug target discovery using retroviruses. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2007, 2(10), 1285-1300. DOI: 10.1517/17460441.2.10.1285. ISSN 1746-0441.

BONINI, Nancy M. a Shelley L. BERGER. The Sustained Impact of Model Organisms in Genetics and Epigenetics. *Genetics*, 2017, 205(1), 1-4. DOI: 10.1534/genetics.116.187864. ISSN 0016-6731.

CASAL, Margret, HASKINS, Mark. Large animal models and gene therapy. *European journal of human genetics*, 2006, 14(3), 266-272. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201535.

COTRIM, Ana P. a Bruce J. BAUM. Gene Therapy: Some History, Applications, Problems, and Prospects. *Toxicologic Pathology*. 2008, 36(1), 97-103. DOI: 10.1177/0192623307309925. ISSN 0192-6233.

COURA, Renata a Nance NARDI. The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virology Journal* 2007, 4(1), DOI: 10.1186/1743-422X-4-99. ISSN 1743-422x.

COURA, Renata dos Santos a Nance Beyer NARDI. A role for adeno-associated viral vectors in gene therapy. *Genetics and Molecular Biology*, 2008, 31(1). DOI: 10.1590/S1415-47572008000100001. ISSN 1415-4757.

COX, Michael M., Jennifer A. DOUDNA a Michael O'DONNELL. *Molecular biology: principles and practice*. New York: W.H. Freeman and Company, 2012. s. 47-51, ISBN 978-0-7167-7998-8.

DOUGLAS, Joanne T. Adenoviral vectors for gene therapy. *Molecular Biotechnology*, 2007-5-14, 36(1), 71-80. DOI: 10.1007/s12033-007-0021-5. ISSN 1073-6085.

EDELSTEIN, Michael L. MOHAMMAD, Abedi R. WIXON, Jo. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007- an update. *The journal of gene medicine*. 2007-8-23, 9, 833-842. DOI: 10.1002/jgm.1100.

EMBORG, M. E. Nonhuman Primate Models of Parkinson's Disease. *ILAR Journal*, 2007, 48(4), 339-355. DOI: 10.1093/ilar.48.4.339. ISSN 1084-2020.

ESCORS, David a Karine BRECKPOT. Lentiviral Vectors in Gene Therapy: Their Current Status and Future Potential. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2010, 58(2), 107-119. DOI: 10.1007/s00005-010-0063-4. ISSN 0004-069x.

FRAGA, Dean, Tea MEULIA a Steven FENSTER. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2008, 10.3.1. DOI: 10.1002/9780470089941.et1003s08. ISBN 9780470089941.

GAPLOVSKÝ, Martin a Katarína GAPLOVSKÁ-KYSELÁ. Princípy nových metód sekvenovania DNA. *Chemické listy*. 2010, (106), 809-817.

GIACCA, Mauro a Serena ZACCHIGNA. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *Journal of Controlled Release*, 2012, 161(2), 377-388. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.04.008. ISSN 01683659.

GÓRECKI, Dariusz C. Prospects and problems of gene therapy: an update. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 2005, 6(2), 187-198. DOI: 10.1517/14728214.6.2.187. ISSN 1472-8214.

HÖMIG-HÖLZEL, Cornelia a Suvi SAVOLA. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in Tumor Diagnostics and Prognostics. *Diagnostic Molecular Pathology*, 2012, 21(4), 189-206. DOI: 10.1097/PDM.0b013e3182595516. ISSN 1052-9551.

KING, Nancy MP a Odile COHEN-HAGUENAUER. En Route to Ethical Recommendations for Gene Transfer Clinical Trials. *Molecular Therapy*, 2008, 16(3), 432-438. DOI: 10.1038/mt.2008.13. ISSN 15250016.

LEWIS, Ricki. *Human genetics: concepts and applications*. Eleventh edition. New York, NY: McGraw-Hill, 2015. s. 398- 404, ISBN 978-1-259-09563-4.

LINNARSSON, Sten. Recent advances in DNA sequencing methods – general principles of sample preparation. *Experimental Cell Research*, 2010, 316(8), 1339-1343. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.02.036. ISSN 00144827.

LUKASHEV, A. N. a A. A. ZAMYATNIN. Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives. *Biochemistry (Moscow)*, 2016, 81(7), 700-708. DOI: 10.1134/S0006297916070063. ISSN 0006-2979.

MLA style: "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 27 Feb 2017.

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1962/

NEČAS, Oldřich. *Obecná biologie: pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd. Praha: H, 2000, s. 435-437 ISBN 80-860-2246-3

Obecný MLPA protokol pro detekci a kvantifikaci nukleových kyselin. *BIOGEN: Molekulární biologie a genetika* [online]. Dostupné z: <http://www.biogen.cz/obecnym-mlpa-protokol-navod-pro-pouziti>

PATHAK, Atul, Soma PATNAIK a Kailash Chand GUPTA. Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery. *Biotechnology Journal*, 2009, 4(11), 1559-1572. DOI: 10.1002/biot.200900161. ISSN 18606768.

PESTANA, Ericka A., Sandor BELAK, Adama DIALLO, John R. CROWTHER a Gerrit J. VILJOEN. Real-Time PCR – The Basic Principles. *Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics - real time PCR applications*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2010, s. 27-46. DOI: 10.1007/978-90-481-3132-7_3. ISBN 978-90-481-3131-0.

PFEIFER, Alexander, Tiongti LIM a Katrin ZIMMERMANN. Lentivirus Transgenesis, 4-13. DOI: 10.1016/S0076-6879(10)77001-4.

RAMAMOORTHY, Murali. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*, 2015, 1-7. DOI: 10.7860/JCDR/2015/10443.5394. ISSN 2249782x.

ROBILLARD, Julie M. ROSKAMS-EDRIS, Dylan. KUZELJEVIC, Boris. ILLES, Judy. Prevailing public perceptions of the ethics of gene therapy. *Human gene therapy*. 2014-8, 25, 740-746. DOI: 10.1089/hum.2014.030.

ROSENBERG, Steven A., Paul AEBERSOLD, Kenneth CORNETTA, et al. Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *New England Journal of Medicine*. 1990, 323(9), 570-578. DOI: 10.1056/NEJM199008303230904. ISSN 0028-4793.

ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*. 3. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2000, s. 1153 - 1172. ISBN 80-902-5624-4.

ROTHER, Michael, Ute MODLICH a Axel SCHAMBACH. Biosafety Challenges for Use of Lentiviral Vectors in Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 2014, 13(6), 453-468. DOI: 10.2174/15665232113136660006. ISSN 15665232.

SANTIAGO-ORTIZ, Jorge L. a David V. SCHAFFER. Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release*, 2016, 240, 287-301. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.01.001. ISSN 01683659.

SAUER, Aisha V., Biagio DI LORENZO, Nicola CARRIGLIO a Alessandro AIUTI. Progress in gene therapy for primary immunodeficiencies using lentiviral vectors. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2014, 14(6), 527-534. DOI: 10.1097/ACI.0000000000000114. ISSN 1528-4050.

SELLNER, Loryn N. a Graham R. TAYLOR. MLPA and MAPH: New techniques for detection of gene deletions. *Human Mutation*, 2004, 23(5), 413-419. DOI: 10.1002/humu.20035. ISSN 1059-7794.

SHERIDAN, Cormac. Gene therapy finds its niche. *Nature Biotechnology*. 2011-2-7, 29, 121–128. DOI: 10.1038/nbt.1769.

SLEEPER, M. M., L. T. BISH a H. L. SWEENEY. Gene Therapy in Large Animal Models of Human Cardiovascular Genetic Disease. *ILAR Journal*, 2009, 50(2), 199-205. DOI: 10.1093/ilar.50.2.199. ISSN 1084-2020.

SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ, Jiřina, ed. *Genetika*. Přeložil Anna MATALOVÁ. Brno: Masarykova univerzita, 2009. s. 512- 514, ISBN 978-80-210-4852-2.

STUPPIA, Liborio, Ivana ANTONUCCI, Giandomenico PALKA a Valentina GATTA. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(12), 3245-3276. DOI: 10.3390/ijms13033245. ISSN 1422-0067.

SULLIVAN, Sean M. Non-Viral Gene Therapy. *A Guide to Human Gene Therapy*, WORLD SCIENTIFIC, 2010. DOI: 10.1142/9789814280914_0001. ISBN 978-981-4280-90-7.

SVOBODA, Jan. Retroviruses and retroelements in diseases and in gene therapy: 15 years later. *Infectious Agents and Cancer*, 2011, 6(1), 6-14. DOI: 10.1186/1750-9378-6-14. ISSN 1750-9378.

VARGAS, José Eduardo, Leonardo CHICAYBAM, Renato Tetelbom STEIN, Amilcar TANURI, Andrés DELGADO-CAÑEDO a Martin H. BONAMINO. Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: advances, current challenges and perspectives. *Journal of Translational Medicine*, 2016, 14(1). DOI: 10.1186/s12967-016-1047-x. ISSN 1479-5876.

VONKA, Vladimír. Gene Therapy: Hopes and Problems. *Genes and Cardiovascular Function*, Boston, MA: Springer US, 2011, s. 7. DOI: 10.1007/978-1-4419-7207-1_2. ISBN 978-1-4419-7206-4

WANG, Weiwei, Wenzhong LI, Nan MA a Gustav STEINHOFF. Non-Viral Gene Delivery Methods. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2013, 14(1), 46-60. DOI: 10.2174/138920113804805278. ISSN 13892010.

WATSON, J. D. a F. H. C. CRICK. THE STRUCTURE OF DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1953, 18, 123-131. DOI: 10.1101/SQB.1953.018.01.020. ISSN 0091-7451.

WHITE, Stefan J., Martijn H. BREUNING a Johan T. DEN DUNNEN. *Detecting Copy Number Changes in Genomic DNA: MAPH and MLPA*, s. 751-767. DOI: 10.1016/S0091-679X(04)75032.

Wirth, T., Parker, N., Ylä-Herttuala, S. (2013) *History of gene therapy*. *Gene*, 525 (2): 162-169. ISSN 0378-1119.

WOLFE, J. H. Gene Therapy in Large Animal Models of Human Genetic Diseases. *ILAR Journal*, 2009, 50(2), 107-111. DOI: 10.1093/ilar.50.2.107. ISSN 1084-2020.

YIN, Hao, Rosemary L. KANASTY, Ahmed A. ELTOUKHY, Arturo J. VEGAS, J. Robert DORKIN a Daniel G. ANDERSON. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2014-7-15, 15(8), 541-555. DOI: 10.1038/nrg3763. ISSN 1471-0056.