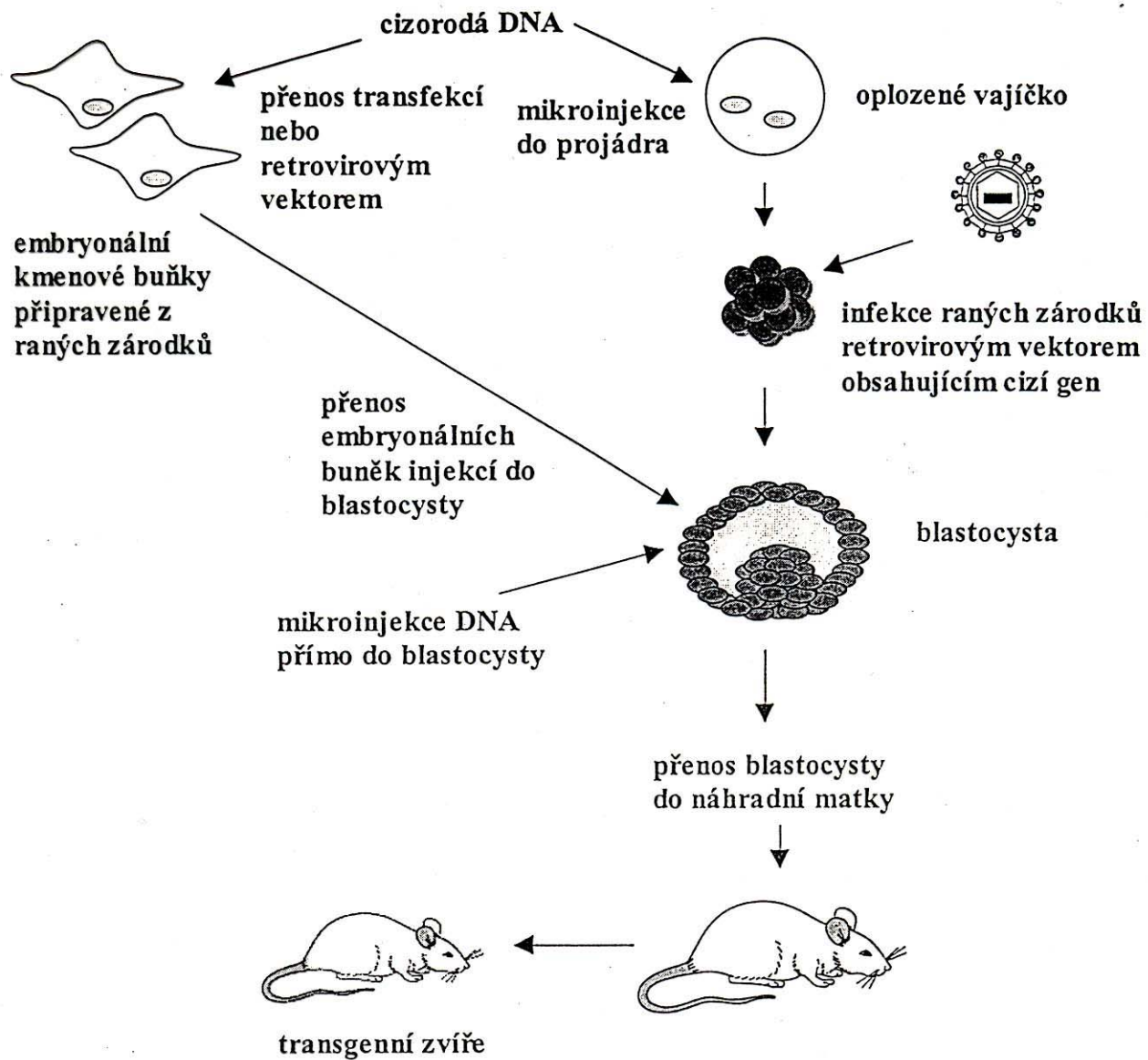
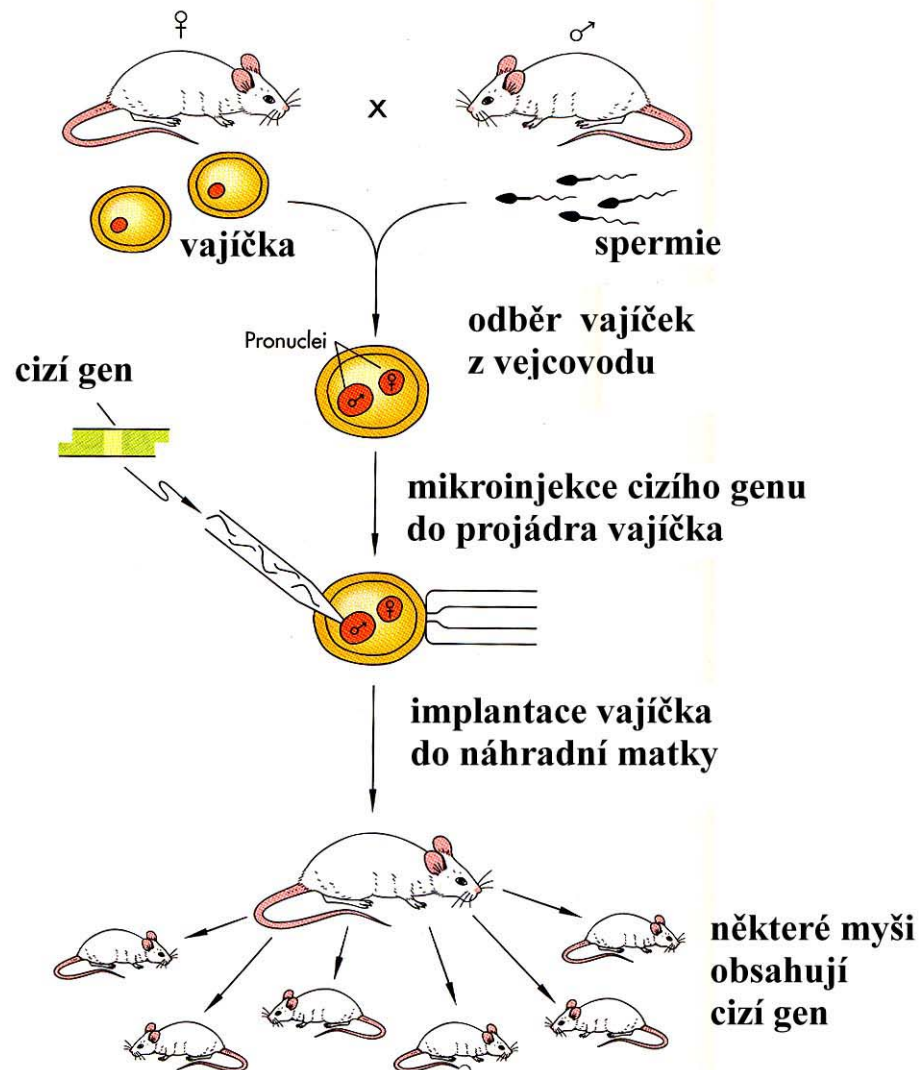


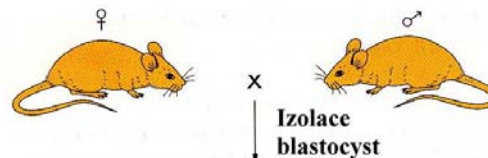
Příprava transgenních savců



Vytváření transgenních myší mikroinjekcí cizího genu do oplozeného vajíčka



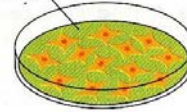
Manipulace s embryonálními kmenovými buňkami



přenos na
Petriho misku



podpurné buňky



kosti

Transfekce, elektroporace,
retrovirová infekce

Vnesení genů

dárkyně
blastocysty



přenos kmenových buněk
do blastocysty

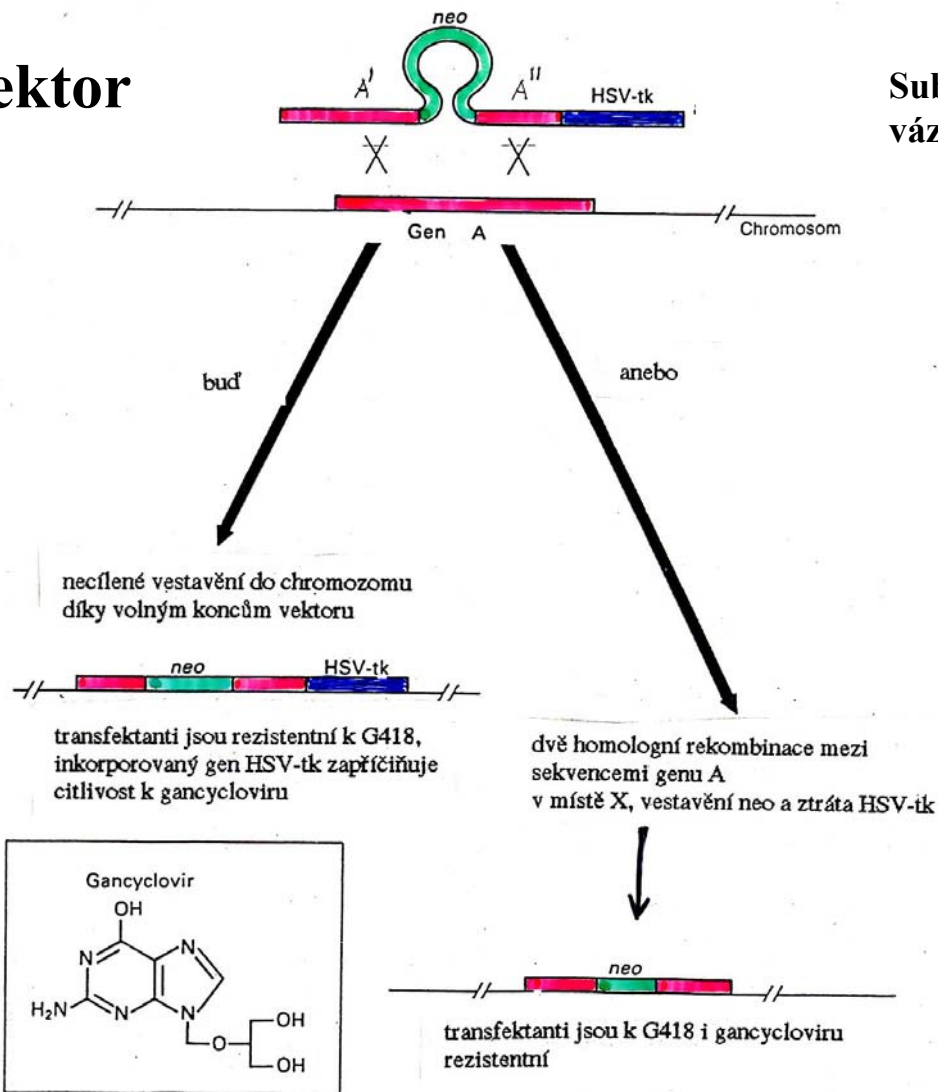


Vrstva fibroblastů, LIF

Terapeutické klonování,
náhrada tkání a orgánů

Selekce ES buněk, v nichž došlo k začlenění vneseného genu homologní rekombinací

PNS vektor



Substituční vektor pro gen A, který je vázán na HSV-tk a přerušen genem neo

Pozitivní selekce = G418

Negativní selekce = HSV-tk

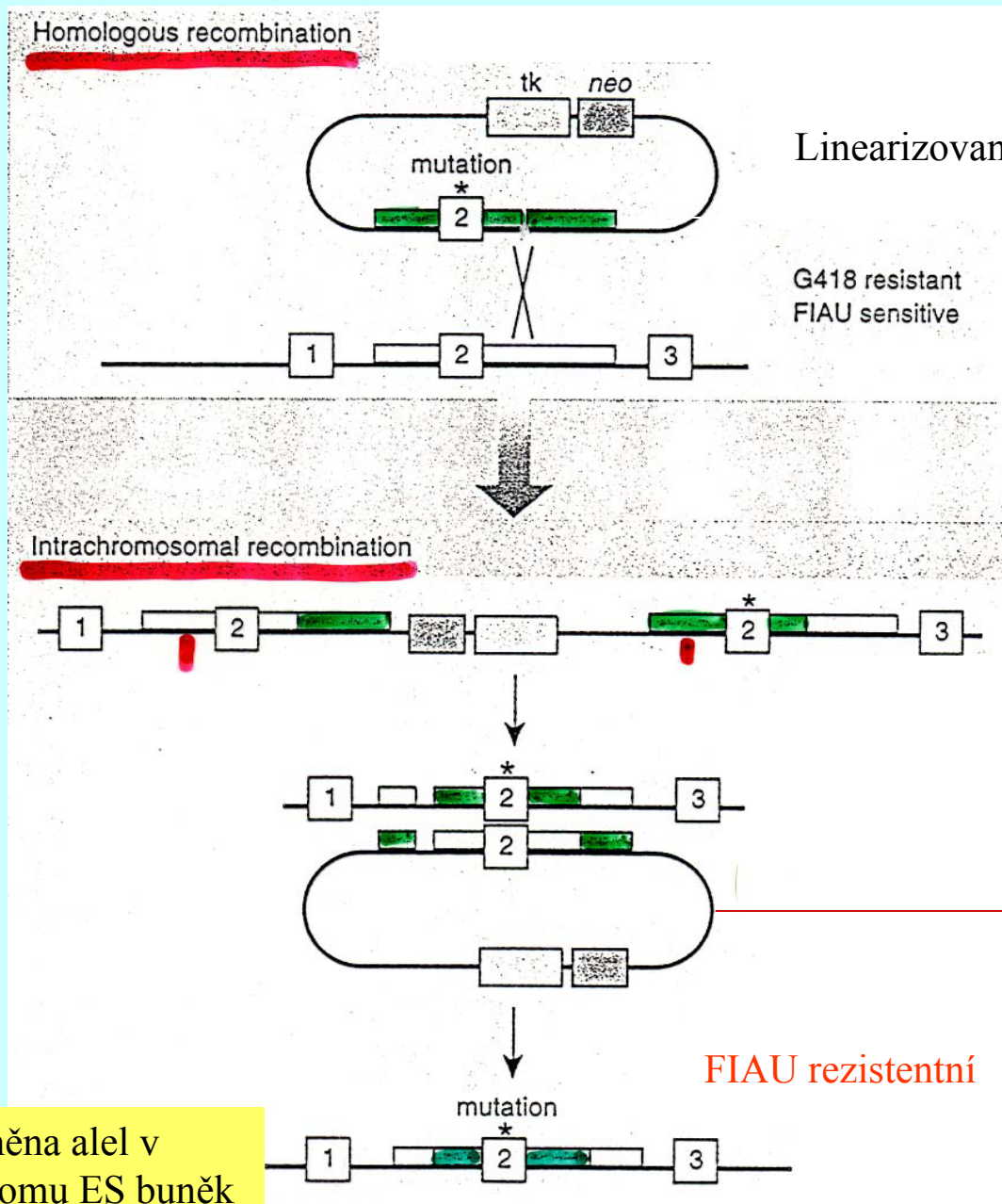


2000x obohacení o
buňky obsahující
přerušný gen A

Gen A je inaktivní - vznik nulové mutace

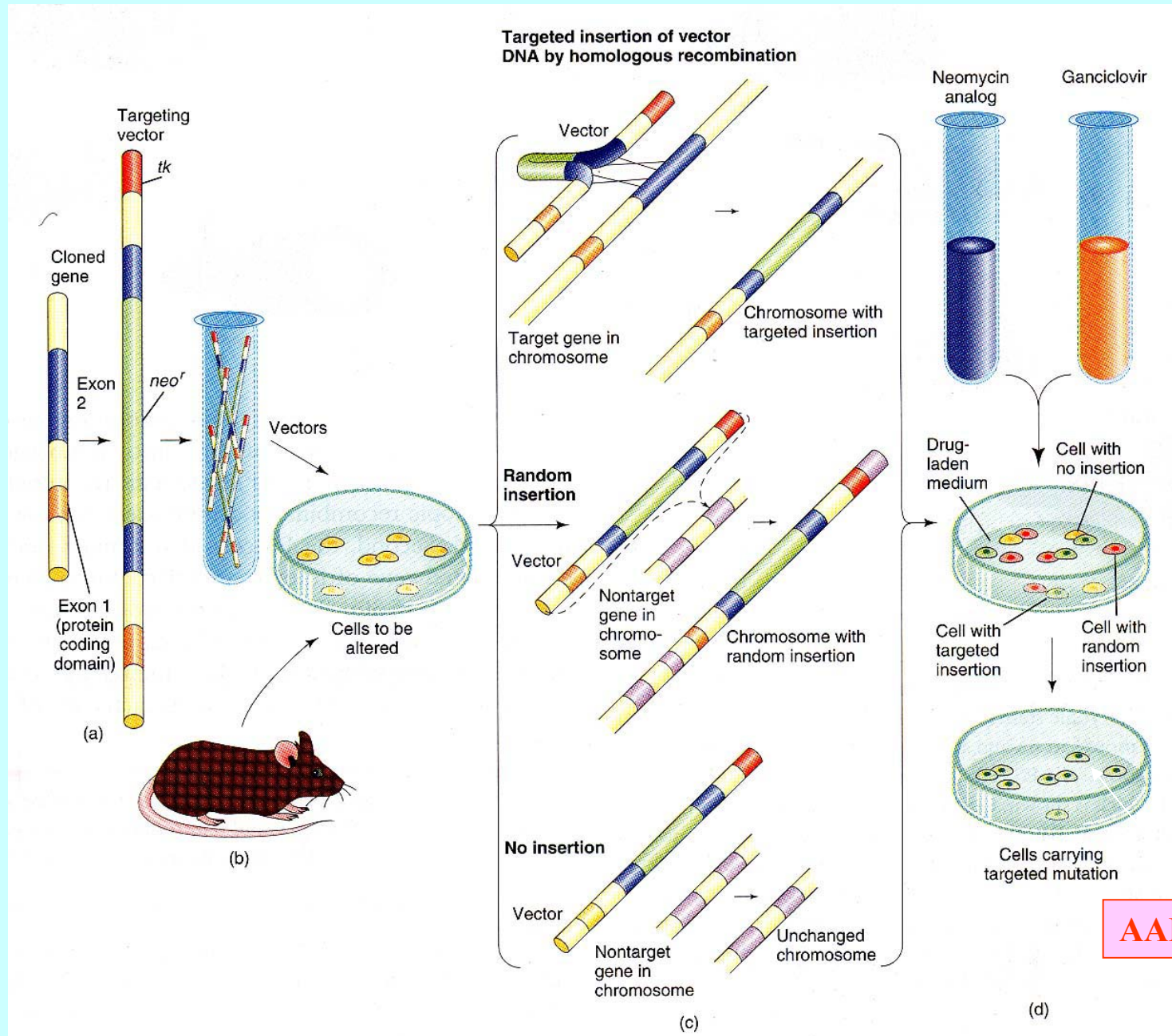
Gancyclovir je nukleotidový analog, který selektivně usmrcuje buňky exprimující HSV-tk (tymidinkináza je schopná začleňovat gancyclovir do DNA)

Náhrada alel v ES buňkách



FIAU = deoxyfluoroarabinofuranosyl-iodouridin

Příprava ES buněk s geny knokautovanými homologní rekombinací



Vytvoření myši nesoucí knokautovaný gen

(a)

Normal chromosome

Targeted mutation

A = aguti, a = black, M = standardní gen, m = mutantní alela

Newborn chimeric male
(carrying cells from two mouse strains)

aaMM + AAMm

aaMM

Black female

AAMm

ES cells
from brown mouse

Blastocyst-stage embryo

aaMM plus AAMm
Altered embryo

Surrogate mother

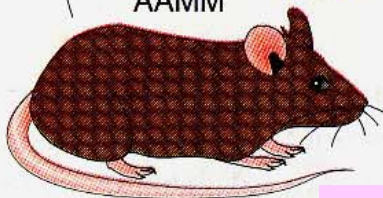
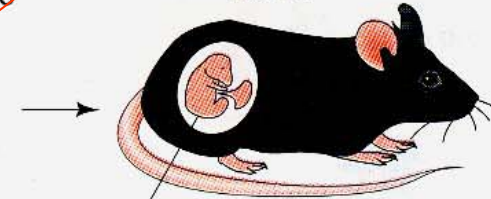
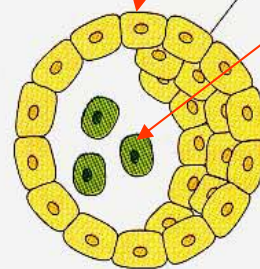
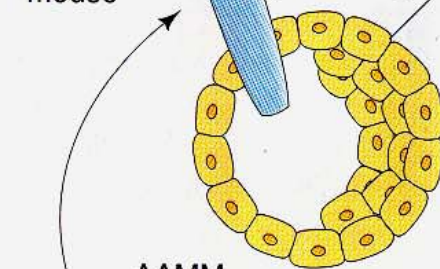
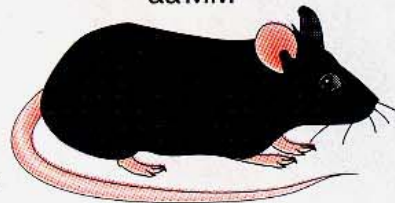
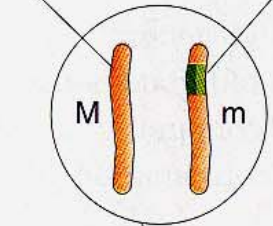
Embryo

aaMM

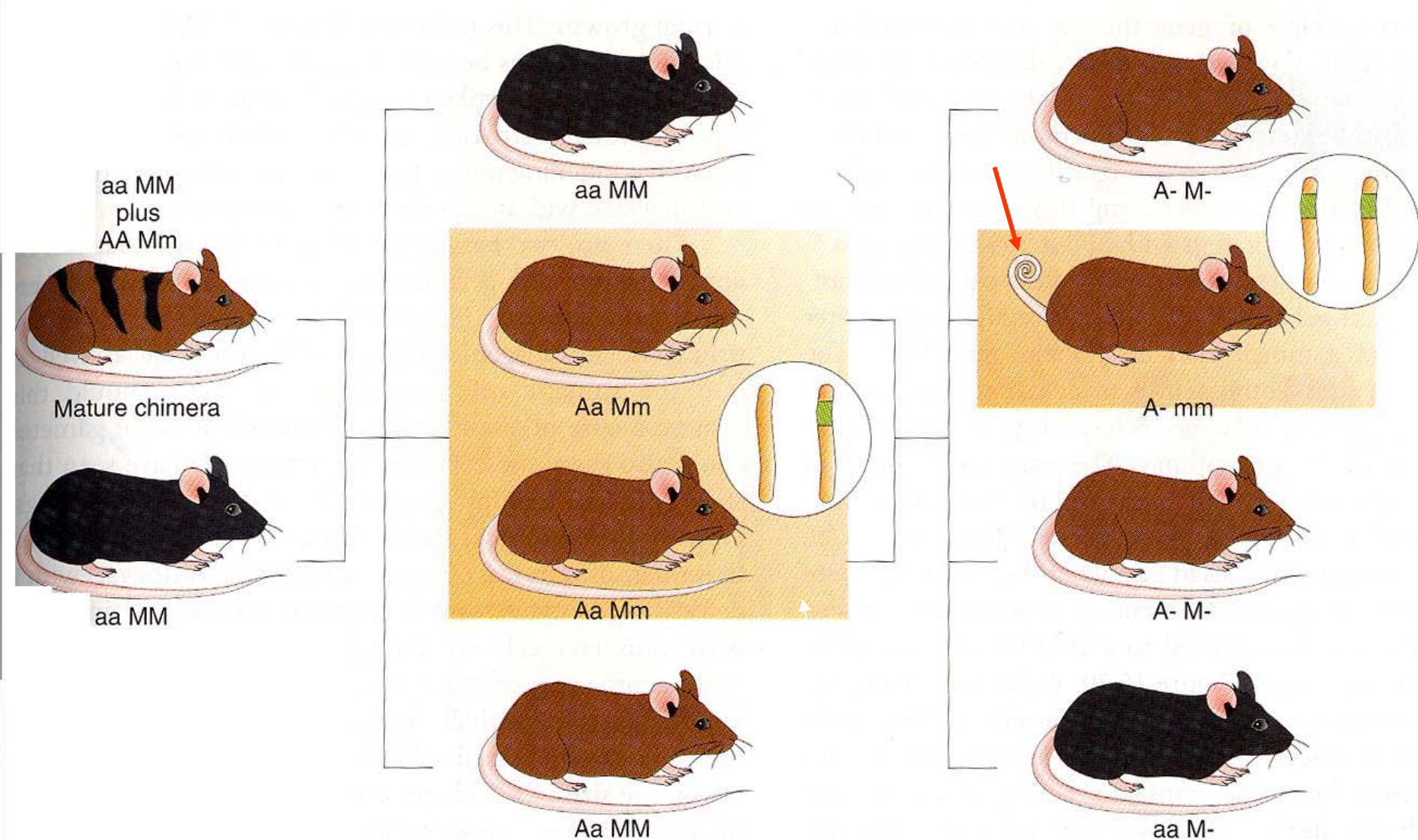
AAMM

Brown mouse

Dárkyně ES buněk



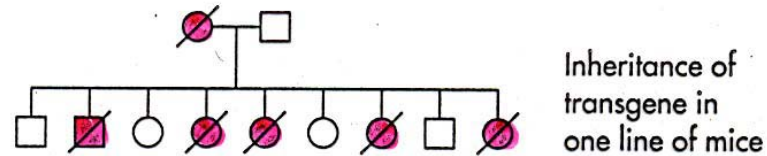
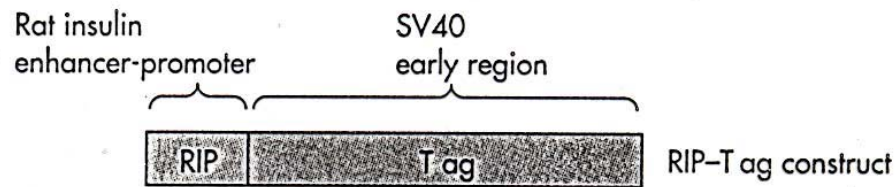
Pokračování - vytvoření myši s knokautovaným genem



Stanovení genotypu analýzou DNA

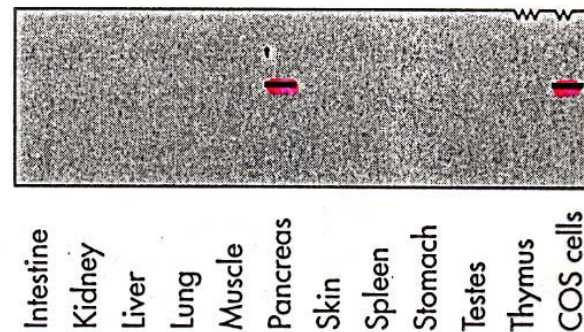
Cílená exprese genu ve specifické tkáni

Řídí tkáňově specifickou expresi klonovaného genu do beta-buněk pankreatu



- Normal male
- Normal female
- Transgenic male
- Transgenic female
- / Mice that died before 12 weeks of age

Transgen se exprimuje jen v pankreatu, kde navozuje vznik nádorů. V ostatních tkáních se neexprimuje



T antigen

Detekce protilátkou

Konstitutivní tvorba T-ag

Tissue-specific expression of transgene

Využití transgenů k usmrcování specifických buněčných typů (mikrochirurgické zásahy)

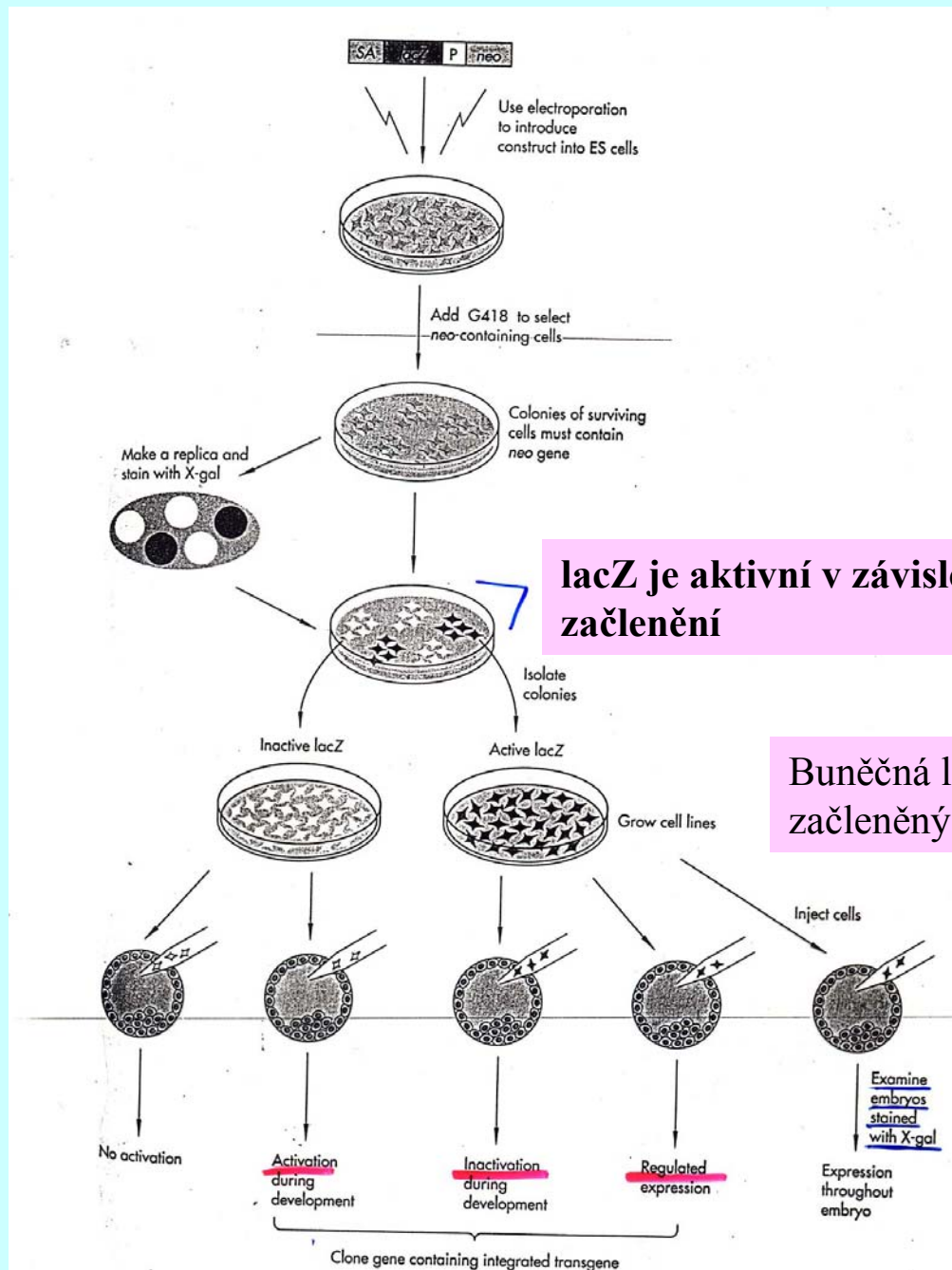
Gen kódující toxin (transgen) je začleněn za regulační oblast aktivní v určité tkáni - exprese transgenu je tak cílena do buněk této tkáni

Toxiny: difterický toxin, T-antigen SV40, ricin (lektin)

Problém: exprese genu pro toxin v okamžiku aktivace endogenu (např. v časně fázi vývoje) může být letální pro organismus

Alternativa: použití genu TK z HSV, který je zapojen za specifickou E-P sekvencí. Buňky s tímto genem nejsou usmrceny, dokud nejsou do organismu injikovány syntetické toxické nukleotidy - ty nejsou toxické pro buňky, v nichž k expresi genu nedochází, protože v nich není aktivována specifická E-P sekvence. V buňkách, v nichž je E-P aktivní, dochází k expresi TK, která syntetické nukleotidy metabolizuje na produkty, které zabíjejí dělící se buňky exprimující daný gen.

Využití reportérových genů k vyhledání genů aktivních v určitých fázích vývoje



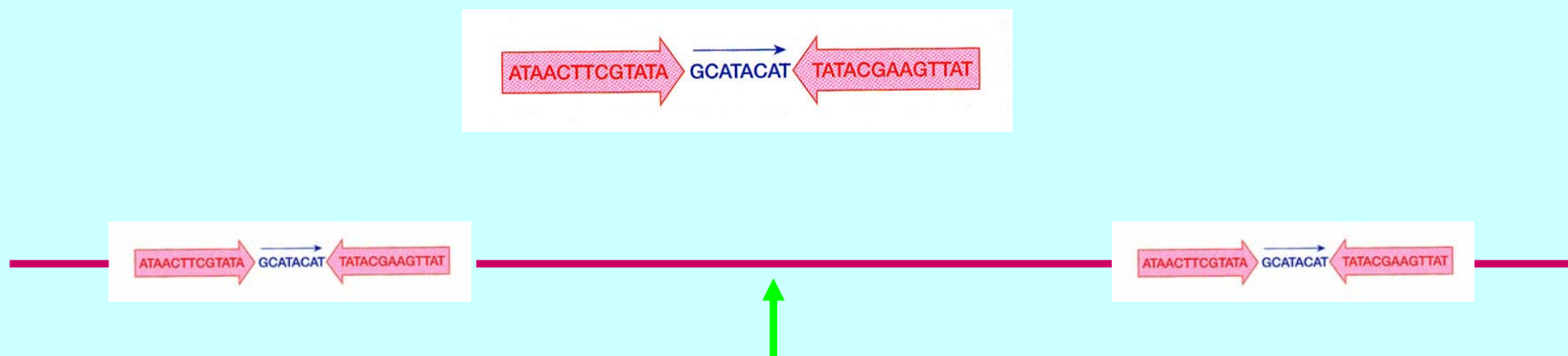
Analogicky lze využít retrovirových vektorů s reportérovými geny - infekce tkání vyvíjejícího se organismu

Buněčná linie obsahující transgen (lacZ) začleněný v konkrétním místě (genu)

Sledování exprese genu během vývoje embrya

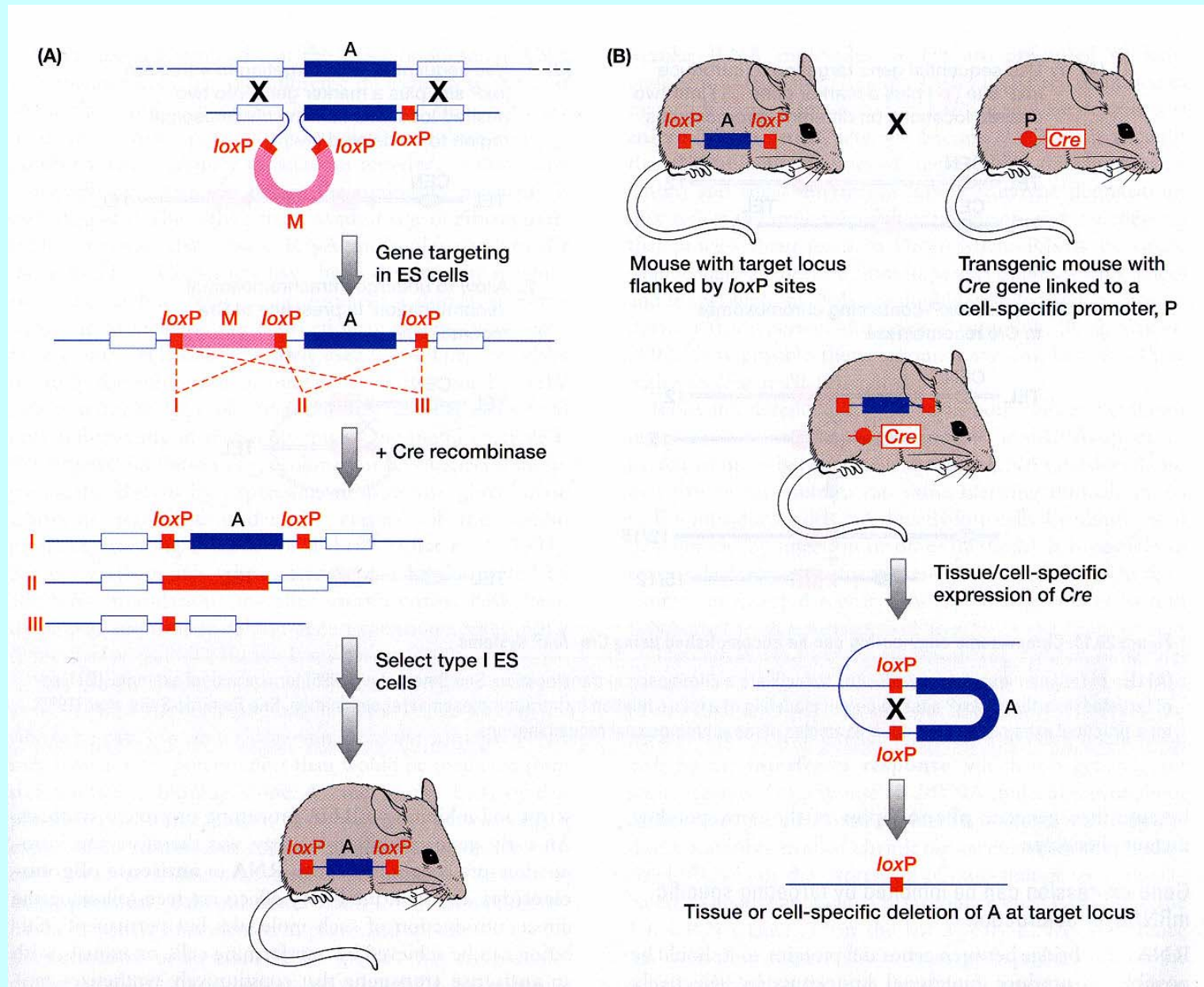
Inzerční inaktivace genů vede k pozměněným fenotypům, izolace těchto genů

Struktura rozpoznávací sekvence lox P fága P1



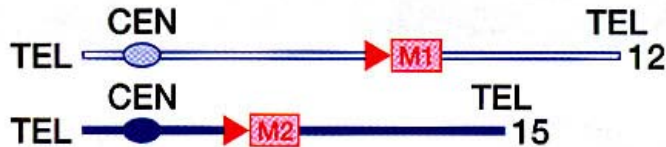
Podle orientace loxP sekvencí je úsek DNA mezi nimi místně specifickou rekombinací prostřednictvím Cre-rekombinázy buď deletován nebo invertován

Využití Cre-loxP rekombinačního systému k selektivní inaktivaci genů

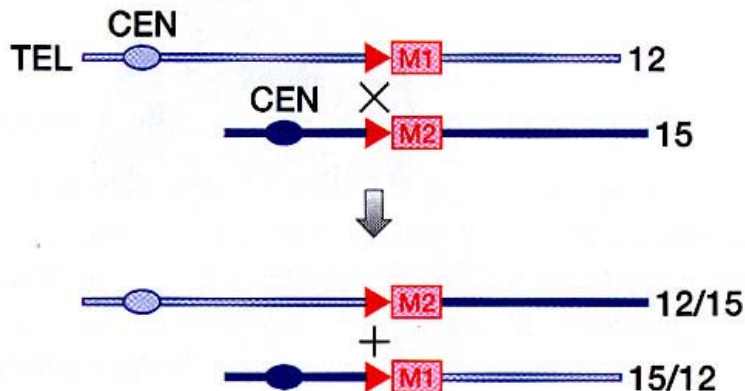


Inženýrství chromozomů s využitím rekombinačního systému Cre-LoxP

- (A) 1. Use sequential gene targeting to introduce *loxP* site (▶) plus a marker gene (M) into two desired locations on different chromosomes



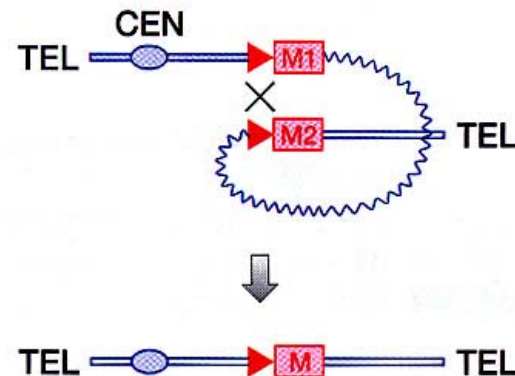
2. Expose *loxP*-containing chromosomes to Cre recombinase



- (B) 1. Use sequential gene targeting to introduce *loxP* site plus a marker gene into two desired locations flanking chromosomal region to be deleted (wavy line)



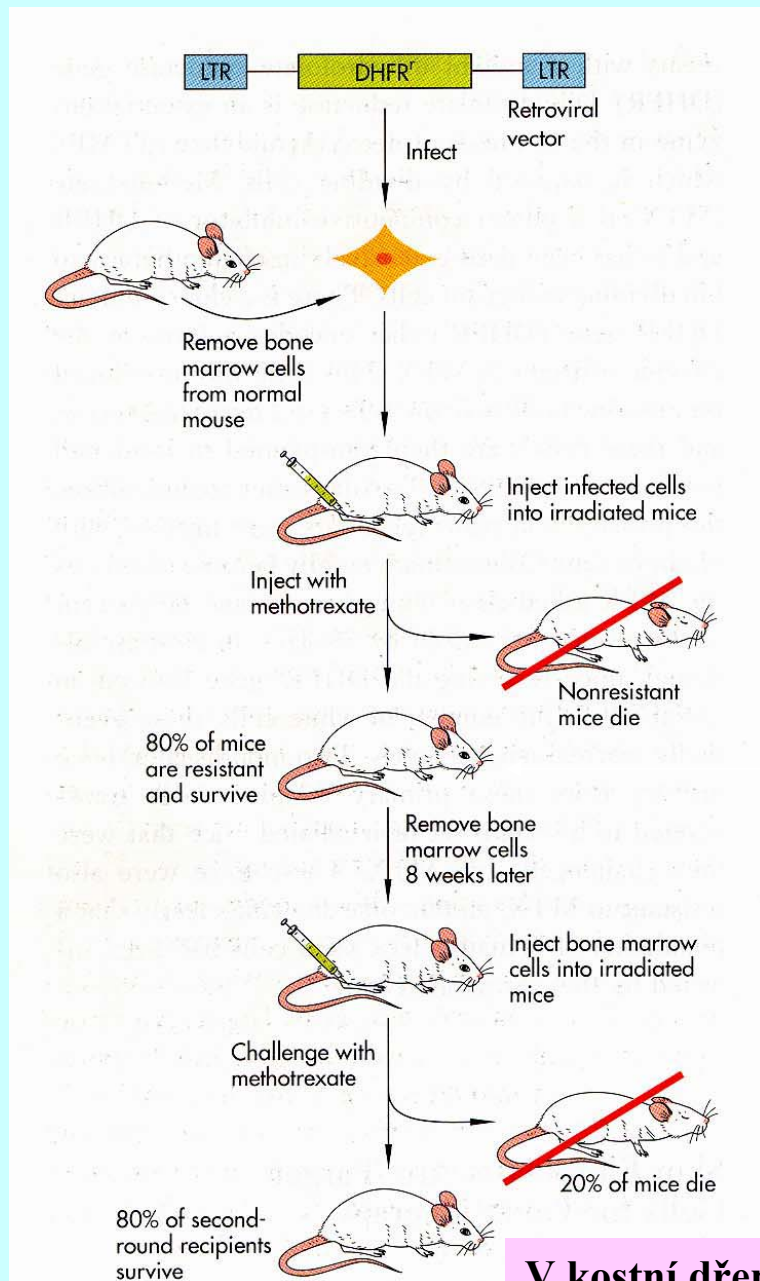
2. Allow to undergo intrachromosomal 'recombination' in presence of Cre recombinase



Korekce genetických defektů v transgenních zvířatech

- může být normální funkce obnovena zavedením normálního genu do buňky nesoucí mutantní formu genu (aniž by došlo k začlenění homologickou rekombinací)?
- bude ke korekci docházet v případě, že se produkt tvoří v jiných tkáních?
- bude množství funkčního proteinu dostačující?
- jaké budou vedlejší efekty?

Buňky se zavedeným transgenem přežívají in vivo



Mutantní forma DHFR rezistentní k metotrexátu

Usmrcení vlastních kmenových buněk zářením

Primární recipient

V kostní dřeni se exprimuje DHFR, tj. buňky z primárního recipienta v ní přežívají

GENOVÉ TERAPIE

LÉČBA GENETICKÝCH CHOROB

- DĚDIČNÝCH
- NÁDOROVÝCH

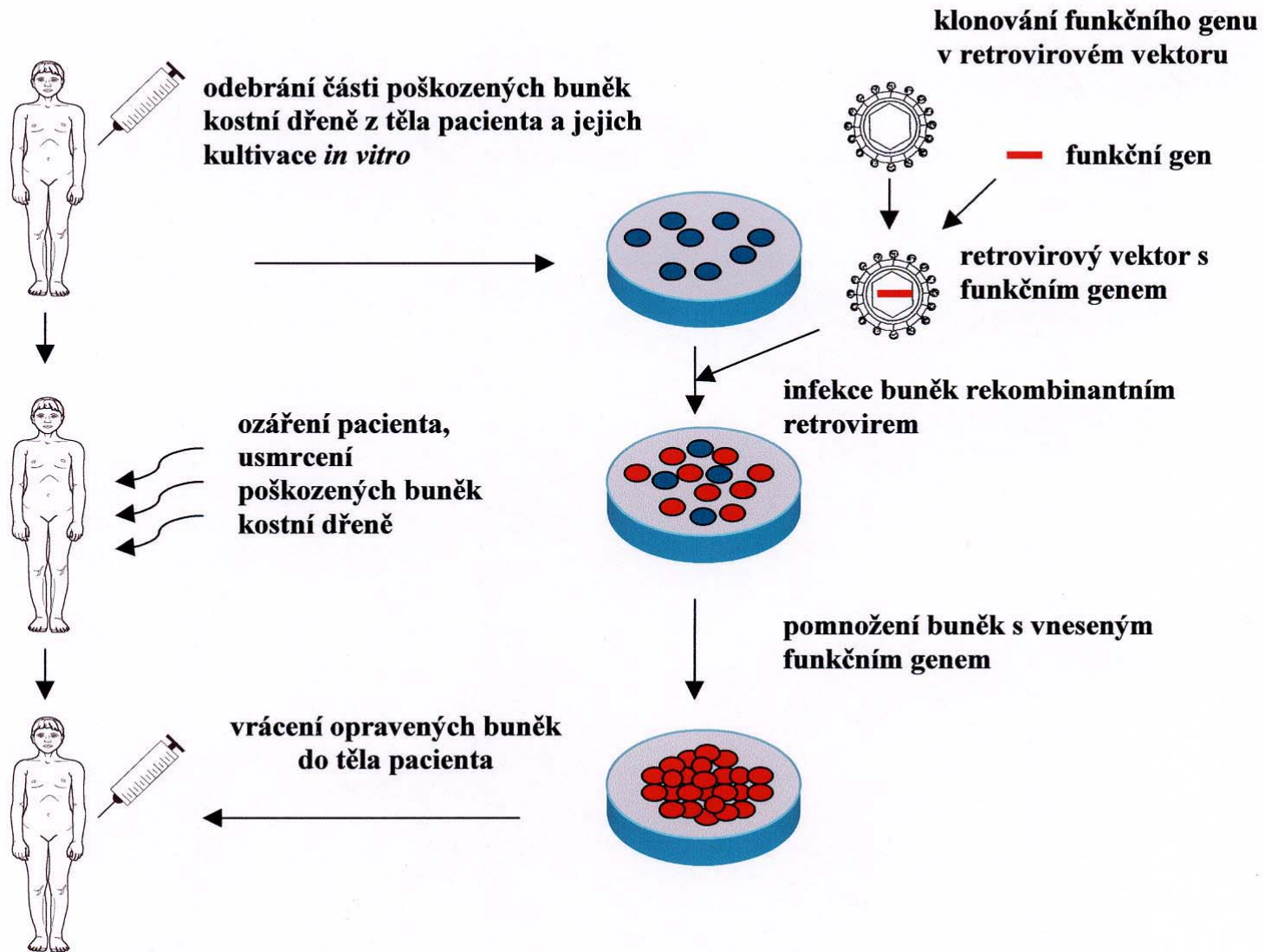
- **PODLE TYPU BUNĚK, DO NICHŽ JSOU GENY VNÁŠENY:**
 - a. GENOVÁ TERAPIE ZÁRODEČNÝCH BUNĚK
 - b. GENOVÁ TERAPIE SOMATICKÝCH BUNĚK

- **PODLE ZPŮSOBU PŘENOSU GENŮ**
 - A. GENOVÁ TERAPIE *IN VITRO* (*EX VIVO*)
 - B. GENOVÁ TERAPIE *IN VIVO*

Možné způsoby léčby genetických onemocnění

- 1. Úprava diety - karenční terapie (galaktosemie, fenylketonurie)**
- 2. Substituční terapie (hemofilie, diabetes, nanismus)**
- 3. Genová terapie (kauzální léčba)**
 - vnesení funkčního genu (funkční alela navíc)**
 - cílená oprava mutace homologní rekombinací**
 - cílené usmrcování geneticky pozměněných buněk**
 - cílená inhibice exprese genů zodpovědných za genetickou poruchu**

Genová terapie in vitro



Vlastnosti buněk vhodných jako vektory pro zavádění genů do organismu

- 1. Snadné získání buněk z těla**
- 2. Snadná kultivace v kulturách in vitro**
- 3. Odolnost k manipulacím spojeným se zaváděním genů**
- 4. Schopnost navrácení buněk do organismu, kde se musí pomnožovat a přetrvávat po dostatečně dlouhou dobu**

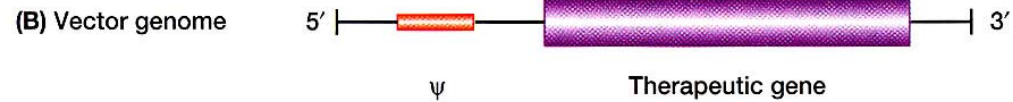
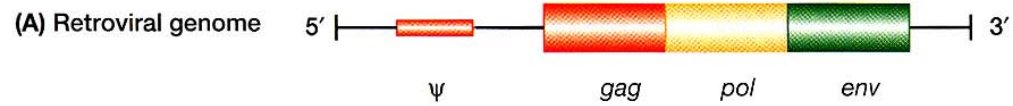
*** Kmenové buňky kostní dřeně**

*** Kožní fibroblasty**

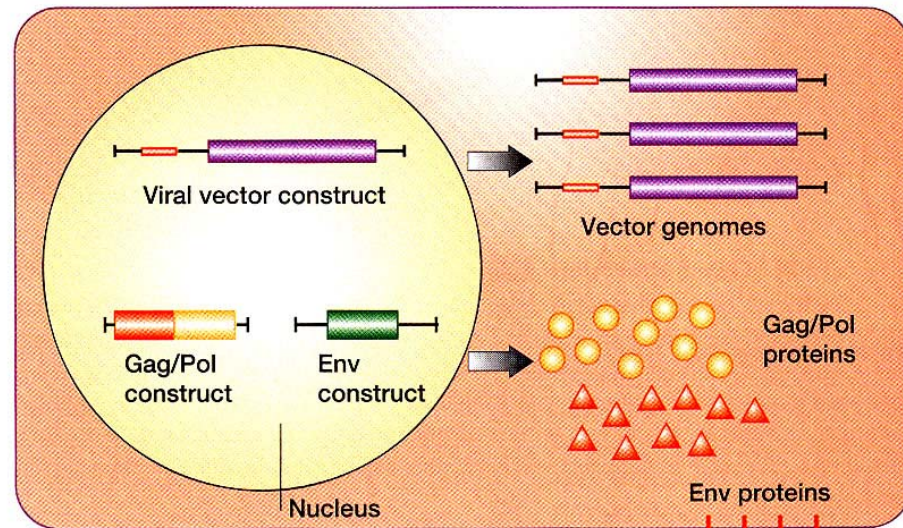
*** Hepatocyty**

*** Myelocyty**

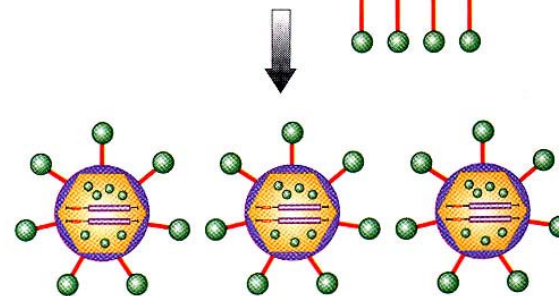
Konstrukce retrovirových vektorů a vytváření infekčních virových částic



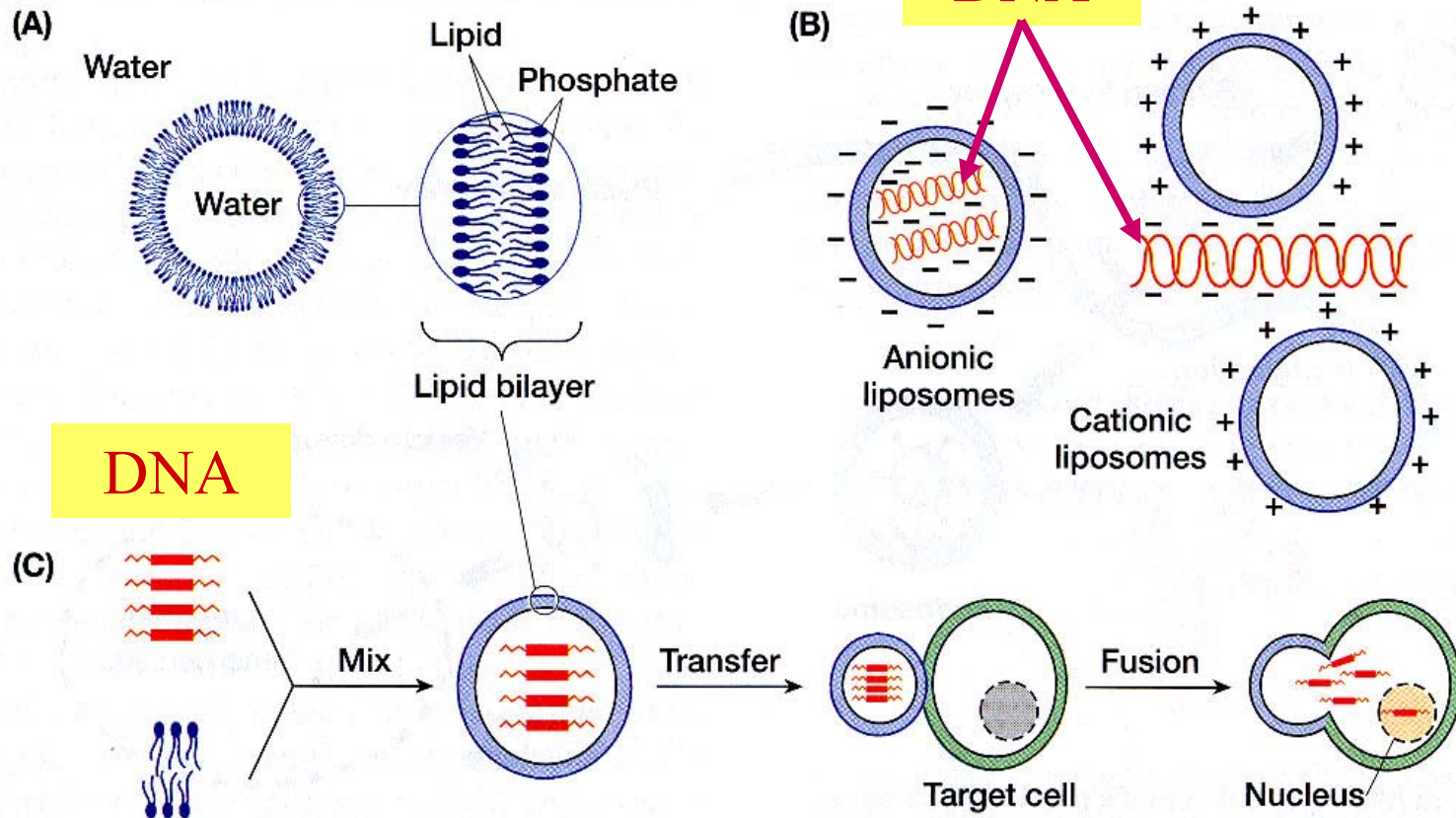
(C) Packaging cell



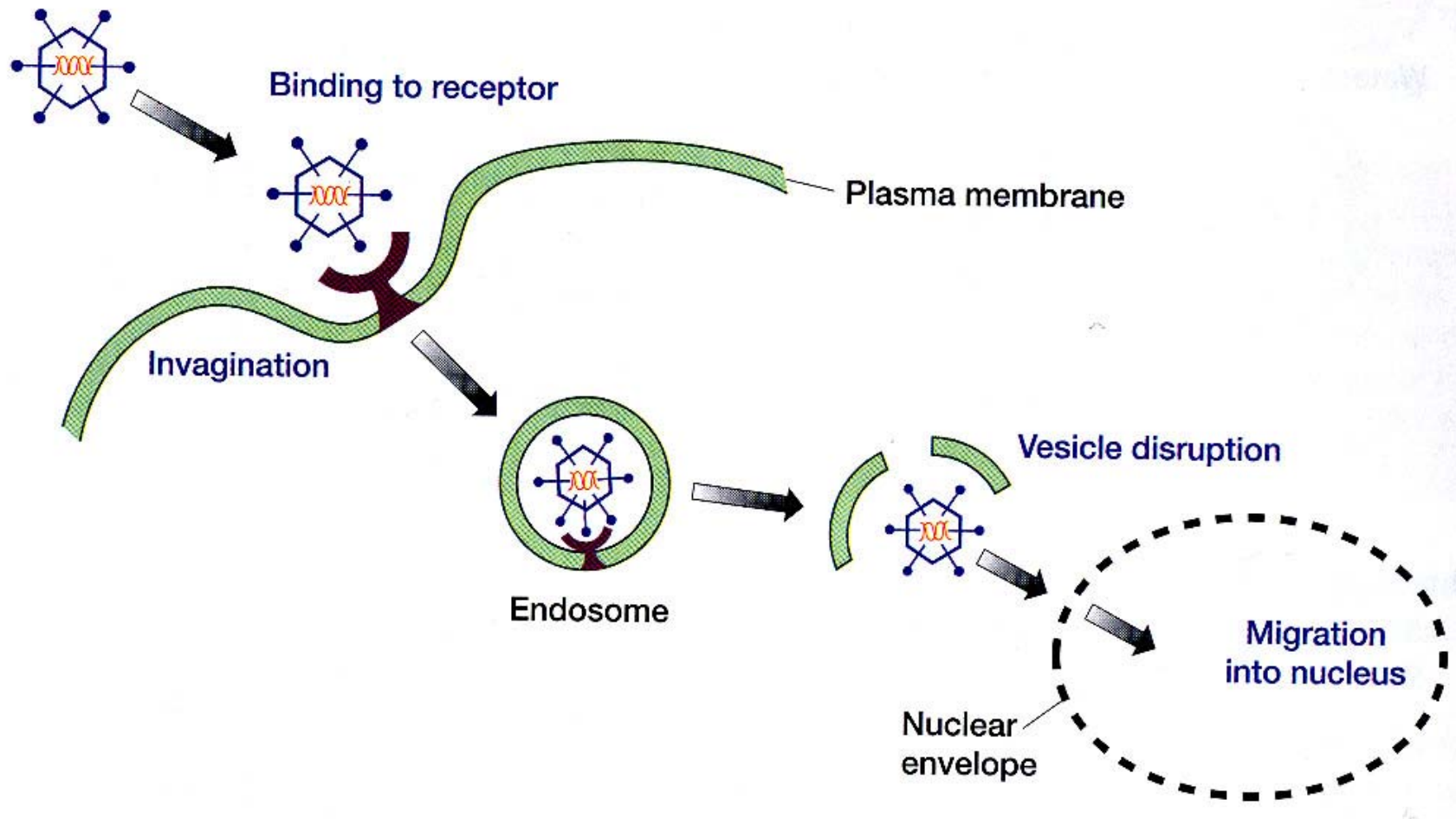
**Retrovirové vektory
schopné infikovat
cílové buňky**



Využití lipozomů pro vnášení genů in vivo



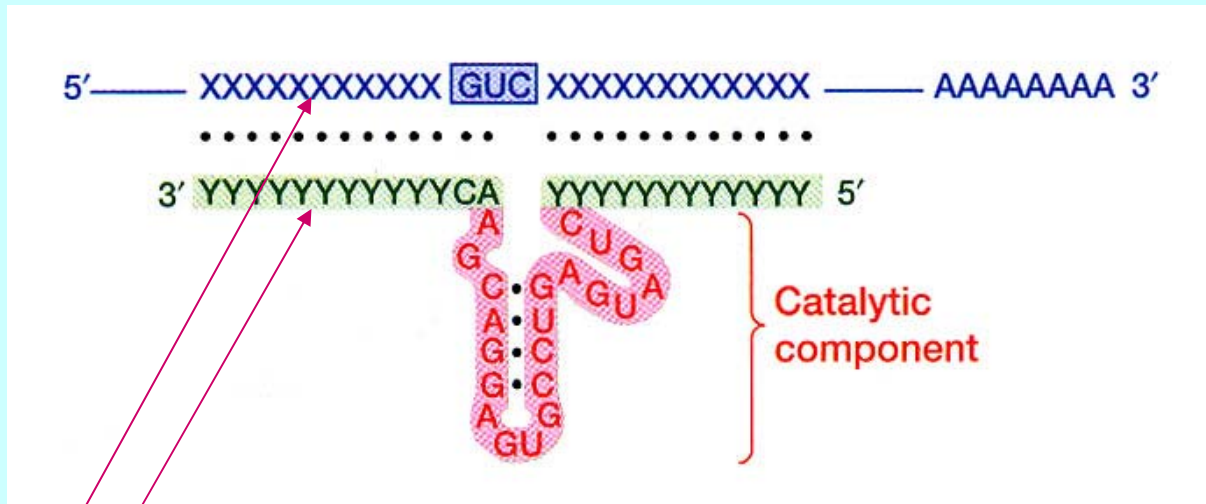
Přenos genů endocytózou zprostředkovanou receptory



Metody opravy nebo inaktivace patogenních genů v buňkách a tkáních

- A. Oprava mutantní alely homologní rekombinací**
- B. Inhibice translace pomocí antisense oligonukleotidů**
- C. Selektivní destrukce nebo reparace mRNA pomocí ribozymu**
- D. Selektivní inhibice mutantní alely RNA interferencí**

Použití ribozymu typu „hammerhead“ ke štěpení mutantní mRNA

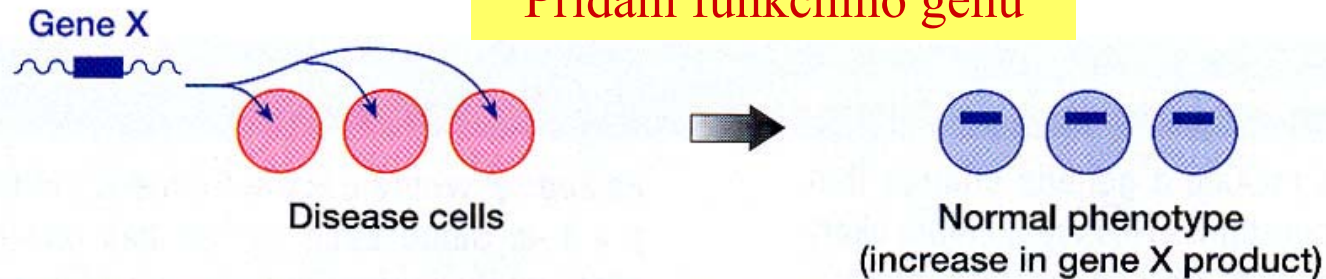


Komplementární úseky

Strategie genové terapie

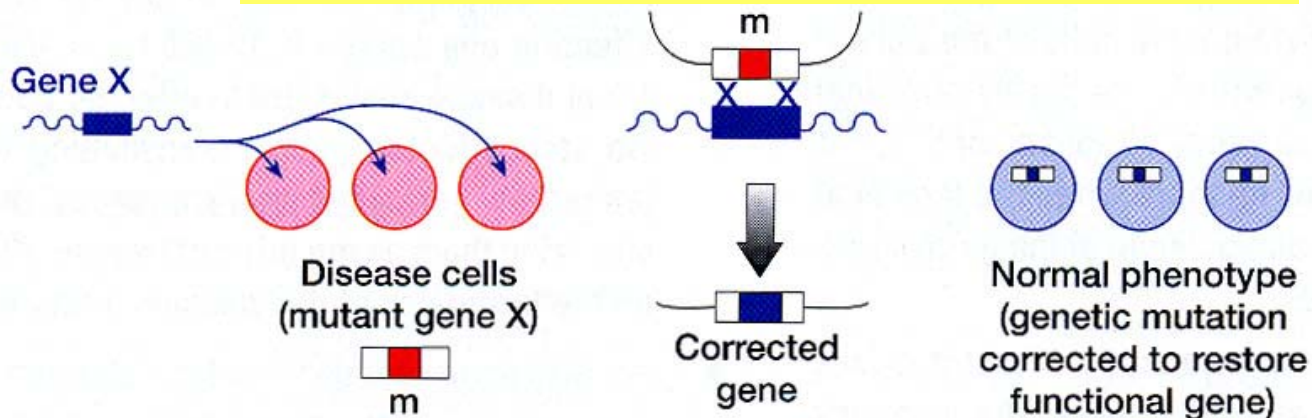
(A)

Přidání funkčního genu



(B)

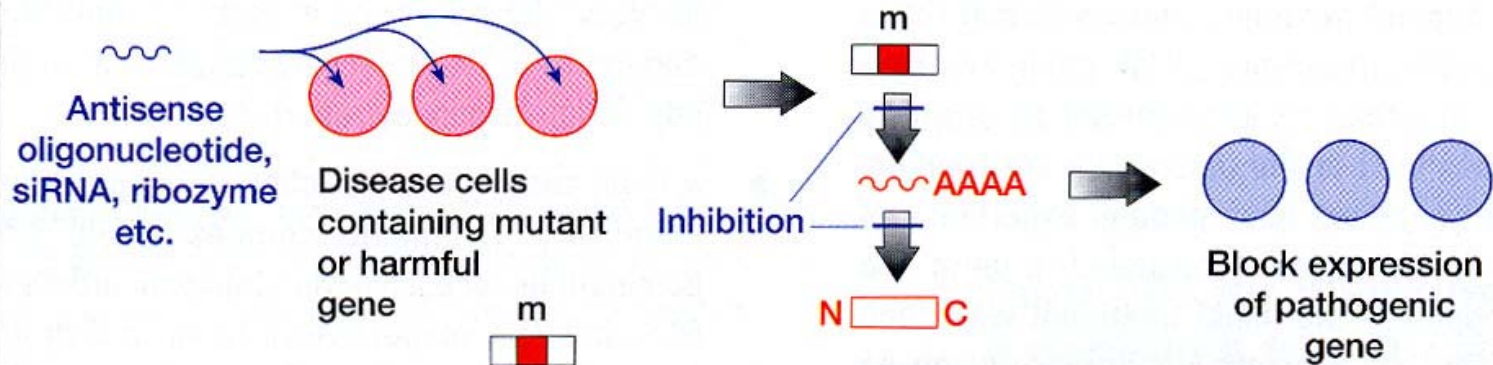
Záměna mutantní formy genu za normální



Strategie genové terapie

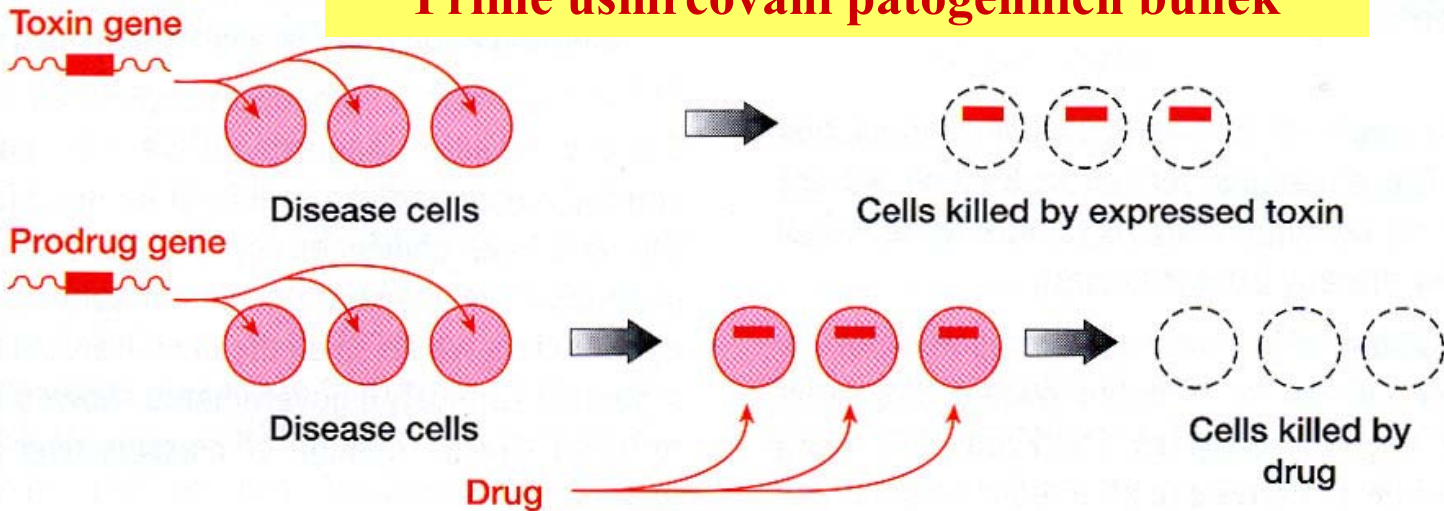
(C)

Cílená inhibice genové exprese



(D)

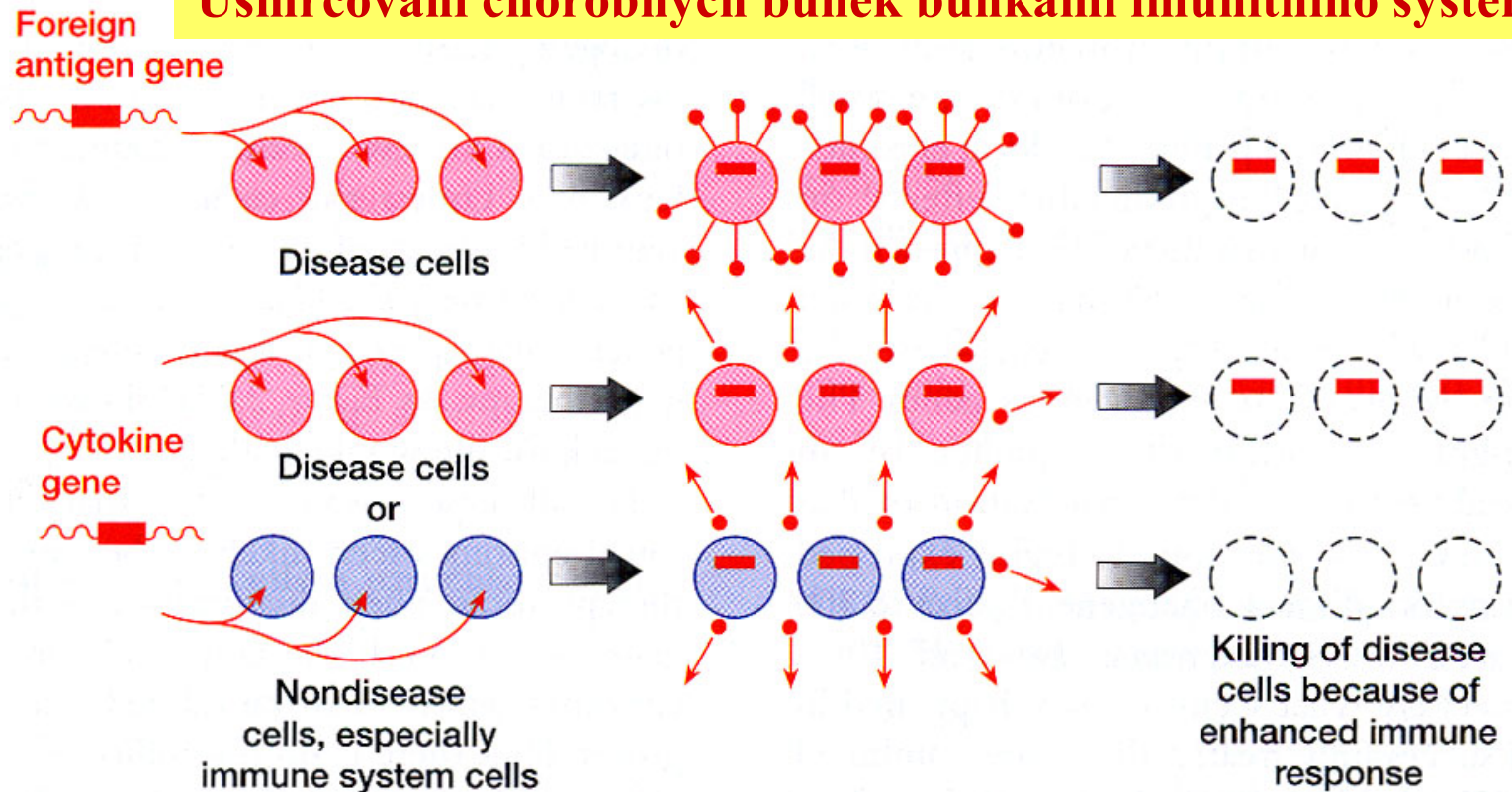
Přímé usmrcování patogenních buněk



Strategie genové terapie

(E)

Usmrcování chorobných buněk buňkami imunitního systému

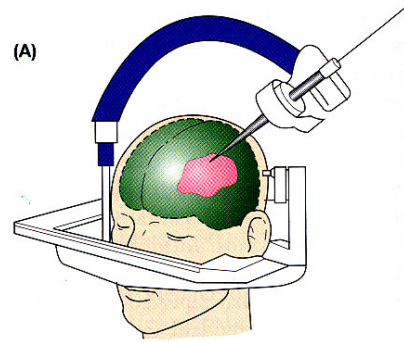


Možnosti léčby nádorů pomocí genové terapie

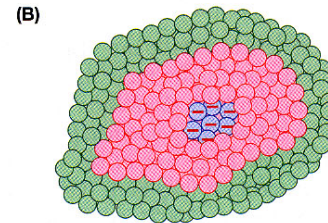
Typ nádoru	Změněné buňky	Použitá strategie genové terapie
Vaječník	Nádorové buňky	Intraperitoneální injekce retrovirů nebo adenovirů s genem p53 nebo BRCA1 – obnova kontroly buněčného cyklu
Vaječník	Nádorové buňky	Injekce adenoviru s scFv protilátkou proti onkoproteinu ErbB2. Snaha o inaktivaci růstového signálu
Maligní melanom	Tumor-infiltrující lymfocyty (TILs)	Extrakce TILs z tumoru a jejich pomnožení. Infekce TILs retrovirem s genem pro nekrotický faktor, který pak působí na okolní buňky v nádoru
Různé nádory	Nádorové buňky	Transfekce nádorových buněk retrovirem exprimujícím povrchový antigen (HLA-B7) nebo cytokin (IL-12), což by mělo zvýšit imunogenicitu tumoru, takže jej imunitní systém snáze zničí
prostata	Dendritické buňky	Na autologní dendritické buňky se působí tumorovým antigenem nebo cDNA exprimující antigen aby zahájily imunitní odpověď vůči tumoru
Maligní gliom (mozek)	Nádorové buňky	Injekce retroviru s TK do tumoru. Jsou infikovány jen rostoucí buňky. Je přidán gancyklovir, který TK-pozitivní buňky (tj. tumorové) mění na toxin a jsou tak samy selektivně usmrcovány

Genová terapie nádorů *in vivo*

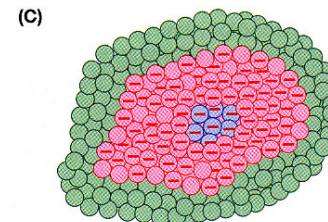
Do nádoru jsou injikovány buňky, do nichž byl *in vitro* vnesen retrovirový vektor, který obsahuje gen pro tymidinkinázu (TK). Vektor se uvolňuje a infikuje okolní nádorové buňky, v nichž se pak vytváří TK (retrovirus je schopen infikovat jen dělící se buňky!). Do těla pacienta je podán intravenózně netoxická látka gancyklovir (gcv), který je TK konvertován na toxický gcv-trifosfát usmrcující buňky.



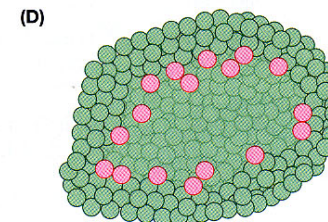
MRI-guided stereotactic implantation of vector producer cells (VPC) into CNS tumors *in situ*



Vector producing cells inside the tumor



Retroviruses infect tumor cells but not normal cells



Gancyclovir kills the infected cells