

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Gabriela Štarmanová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická

Genová terapie, genová terapeutika a epigenetika
Bakalářská práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Gene therapy, Gene Therapeutics and Epigenetics
Bachelor thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Gabriela Štarmanová**
Osobní číslo: **C20270**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Genová terapie, genová terapeutika a epigenetika**
Téma práce anglicky: **Gene Therapy, Gene Therapeutics and Epigenetics**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Rešerše na téma Genová terapie, genová terapeutika a epigenetika
 - a) Genová terapie
 - i. Metody úpravy genů
 - ii. Vnášení genů do organismu
 - b) Léčebné metody pomocí genové terapie
 - c) Genová terapie – epigenetické úpravy

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Lucie Michalcová**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Herbacos Recordati s.r.o.
Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Genová terapie, genová terapeutika a epigenetika jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že 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 směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20. 6. 2023

Gabriela Štarmanová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé práce paní Ing. Lucii Michalcové za cenné rady a doporučení a panu Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D. za vstřícnost a ochotu při konzultacích a za čas, který mi byl věnován.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá popisem, jednotlivými metodami a také využitím genové terapie a epigenetiky. Postupně jsou rozebrány metody vnášení genů, tedy virové i neviróvé transportní vektory, jednotlivé významné metody genové terapie *in vivo* a epigenetické úpravy genů. Spolu s tím jsou konkrétně popsána vybraná využití jak metod úpravy genů, tak epigenetických úprav v genové terapii.

KLÍČOVÁ SLOVA

Genová terapie, virové vektory, neviróvé vektory, CRISPR, TALEN, ZFN, epigenetické úpravy, methylace DNA, RNA interference

TITLE

Gene therapy, Gene Therapeutics and Epigenetics

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the description, methods and also with the application of gene therapy and epigenetics. The methods of gene insertion, such as viral and non-viral transport vectors, the various major methods of *in vivo* gene therapy and epigenetic gene editing are discussed in turn, including specific applications of both gene editing methods and epigenetic editing in gene therapy.

KEYWORDS

Gene therapy, viral vectors, non-viral vectors, CRISPR, TALEN, ZFN, Epigenetics modifications, methylation of DNA, RNA interference

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ.....	10
SEZNAM TABULEK	11
SEZNAM ZKRATEK	12
ÚVOD	14
1. GENOVÁ TERAPIE	15
2. TRANSPORTNÍ VEKTORY GENOVÉ TERAPIE.....	17
2.1 NEVIROVÉ TRANSPORTNÍ VEKTORY.....	18
2.1.1 ANORGANICKÉ ČÁSTICE	18
2.1.2 SYNTETICKÉ NEBO PŘÍRODNÍ BIOLOGICKY ODBOURATELNÉ ČÁSTICE ..	19
2.1.3 FYZIKÁLNÍ METODY	20
2.2 TRANSPORTNÍ VIROVÉ VEKTORY.....	21
2.2.1. ADENOVIRY.....	22
2.2.2 ADENOASOCIOVANÉ VIRY	23
2.2.3 RETROVIRY	24
3. METODY ÚPRAVY GENŮ.....	26
3.1. METODA CRISPR.....	29
3.1.1. VYUŽITÍ V GENOVÉ TERAPII.....	30
3.2. METODA TALENs.....	33
3.2.1. VYUŽITÍ V GENOVÉ TERAPII.....	34
3.3. METODA ZFNs	35
3.3.1. VYUŽITÍ V GENOVÉ TERAPII.....	36
4. EPIGENETICKÉ ÚPRAVY.....	38
4.1. METHYLACE DNA	39
4.1.1. VYUŽITÍ V GENOVÉ TERAPII.....	40
4.2. RNAI.....	42
4.2.1. miRNA.....	43
4.2.2. siRNA	44
4.2.3. VYUŽITÍ V GENOVÉ TERAPII.....	45
ZÁVĚR	47
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1; Struktura adenoviru (Goodsell, 2010).....	23
Obrázek 2; Typy oprav dvouřetězcového zlomu DNA metodami NHEJ a HDR (Sander, Joung, 2014)	26
Obrázek 3; Jednotlivé metody genové terapie a obecný princip (Zhang et al., 2022).....	28
Obrázek 4; Systém CRISPR s jednotlivými variantami RNA, které výsledně tvoří štěpící komplex s proteinem Cas9 (Sander, Joung, 2014)	30
Obrázek 5; Protein TALE s vyznačenou oblastí repetice (Becker, Boch, 2021)	33
Obrázek 6; Struktura proteinů ZF a dimerní restrikční endonukleázy FokI navázané na dsDNA (Isalan, 2012).	36
Obrázek 7; Strukturní pohled na metylaci DNA (Sales et al., 2021).....	40
Obrázek 8; Mechanismy vzniku a působení miRNA a siRNA (Hu et al., 2020).	44

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1; Přehled kategorií nevirových transportních vektorů (Lundstrom, 2018).....	18
Tabulka 2; Přehled významných virových transportních vektorů s konkrétními vlastnostmi, typem genomu a inzertní kapacitou (Lundstrom, 2018).....	21
Tabulka 3; Srovnání metod genové terapie – ZFN, TALEN, CRISPR (Im, Moon, 2016).....	27
Tabulka 4; Seznam epigenetických léčiv (Ciechomska et al., 2019)	40

SEZNAM ZKRATEK

AAV – Adeno-asociované víry

Ad – Adenoviry

AD – Alzheimerova choroba (Alzheimer disease)

Ago – Argonaut proteiny

AID – Aktivačně indukovaná cytosindeaminázy (activation-induced cytosine deaminase)

ASOs – Antisense oligonukleotidy

CAR – Chiméřní antigenní receptory (chimeric antigen receptor)

CRISPR – Segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromatických repetitivních (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

DNMT – DNA methyltransferáza

DSB – Dvouřetězcový zlom (double-strand break)

DsiRNA – Malá interferující RNA upravena endonukleázou Dicer

HD – Huntingtonova choroba (Huntington disease)

HDR – Homologně řízené opravy (homology directed repair)

HSC – Hematopoetická kmenová buňka (hematopoietic stem cell)

lncRNA – Dlouhá nekódující RNA (long non-coding RNA)

miRNA – MikroRNA

MPS – Mukopolysacharidóza

ncRNA – Nekódující RNA (non-coding RNA)

NHEJ – Nehomologní spojování konců (non-homologous end joining)

NLS – Jaderné lokalizační signály (nuclear localization signal)

PAM – Sousední motiv protospaceru (protospacer adjacent motif)

PCR – Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PD – Parkinsonova choroba (Parkinson disease)

piRNA – PIWI-asociované molekuly RNA

pre-crRNA – Prekurzorový transkript CRISPR RNA

rasi-RNA – Malá interferující RNA asociovaná s repeticemi (repeat-associated short interfering RNA)

RISC – Komplex indukovaný RNA k umlčování genů (RNA-induced silencing complex)

RNAi – RNA interference

RVD – Variabilní di-rezidua repetice tvořící variabilní oblast (repeat-variable di-residues)

SAM – S-adenosylmethionin

SCID – ADA – Těžká kombinovaná imunodeficiencie s defektním genem pro enzym adenosindeaminázu (severe combined immunodeficiency)

sgRNA – Jednořetězcová vedoucí RNA (single chain guided RNA)

siRNA – Malá interferující RNA (small interfering)

SNP – Jednobodová mutace vzniklá záměnou jednoho nukleotidu (single-nucleotide polymorphism)

T3SS – Sekreční systém typu III

TALE – Efektory podobné transkripčním aktivátorům (transcription activator-like effector)

tel-sRNA – RNA specifická pro telomery (telomere specific small RNA)

TET – Translokační proteiny (ten-eleven translocation proteins)

tracrRNA – Trans-aktivační CRISPR RNA (trans-activating)

UTR – Nepřekládaná oblast na molekule mRNA (untranslated region)

XPO5 – Exportin 5

ZFN – Nukleázy zinkových prstů (zinc-finger nucleases)

ÚVOD

Genová terapie je technikou, jenž využívá gen/geny k léčbě nebo prevenci onemocnění či zdravotních poruch. Nejčastěji pracuje na základě nahrazení vadného či chybějícího genu v buňkách pacienta zdravou verzí tohoto genu, či na opravách exprimovaných genových produktů. Genovou terapií lze léčit jak dědičná genetická onemocnění, tak i získané poruchy včetně nádorových onemocnění (Gonçalves, Paiva, 2017).

Epigenetika je rychle se rozvíjející vědní obor, který zkoumá změny v genové expresi. Jde o změny, které se netýkají primární struktury DNA (sekvence nukleotidů). Epigenetické mechanismy mohou ovlivnit fenotyp, aniž by měnily genotyp. Mezi tyto mechanismy řadíme například metylaci DNA, modifikaci histonů a RNA interakce. Vliv epigenetiky je pozorovatelný ve více oblastech lidského zdraví. Svou roli hraje jak v rozvoji onemocnění (např. rakoviny prsu), tak v psychice člověka (např. schizofrenie) (Kang et al., 2019).

V této práci jsou popsány metody, kterými lze cílové geny modifikovat a upravovat, jakými způsoby jsou tyto geny doručeny do cílových tkání a jaké mají v současnosti využití jako genová terapeutika. Mimo tradiční metody úpravy genů, mezi které patří například CRISPR, TALENs či ZFNs jsou zmíněny také epigenetické úpravy DNA a terapeutika podmiňující metylaci DNA či RNA interference, které v konečném důsledku degradují cílovou mRNA a znemožňují expresi cílových proteinů. V rámci jednotlivých podkapitol jsou rozebrána konkrétní využití v genové terapii, tedy konkrétní genová terapeutika, která mají potenciál k léčbě, i přesto, že některá jsou stále ve fázi klinických testů či testů na zvířecích modelech.

1. GENOVÁ TERAPIE

Genová terapie je definována jako postup používaný k léčbě nebo zlepšení zdravotního stavu pacienta pomocí genetické modifikace jeho genetické informace. Poskytuje jedinečný přístup k léčbě dědičných i získaných onemocnění tím, že dodává do buněčného jádra terapeutický genový materiál a s ním spojené regulační prvky. Jejím účelem je jednak náprava ztráty funkce způsobené mutací genu, ale také opravy exprese defektního genového produktu na fyziologickou úroveň (Ramamoorth, 2015).

Úpravy genů v rámci genové terapie lze rozdělit na trvalé a tranzientní (přechodné). Trvalou úpravou dochází k opravě defektního genu jako takového, zatímco úpravy tranzientní ovlivňují cílový organismus za pomoci vnášení RNA. V rámci trvalé úpravy lze vyštěpit celý gen zájmu, popřípadě opravit jednobodovou mutaci (SNP). Mezi další možnosti lze zařadit tzv. knock-out genu, který je možno provést různými metodami, jako jsou například RNA interference, či transposonový systém. V rámci tranzientní úpravy je terapeutickým vehikulem RNA, popřípadě mRNA, která může sloužit jako templát pro produkci proteinu jakožto cílového terapeutika (Zhang et al., 2022).

Genovou terapii můžeme obecně rozdělit do dvou kategorií, a to na terapii zárodečných linií a genovou terapii somatických buněk. Rozdíl mezi těmito dvěma přístupy spočívá v tom, že je-li do somatické buňky vnesen terapeutický gen, pak je ovlivněna pouze cílová buňka a provedené změny se nepřenáší na další generace. Naopak u genové terapie gamet dojde k přenosu terapeutického genu do dalších generací, jelikož je ovlivněn genom pohlavních buněk. Z etických důvodů jsou povoleny pouze terapie buněk somatických (Wirth, Parker, 2013).

Koncepce genové terapie vznikla koncem 60. a počátkem 70. let 20. století, kdy probíhal vývoj geneticky značených buněčných linií a objasňování mechanismů transformace buněk způsobené papovaviry – papillomaviry a palyomaviry (SV40). Klonované geny se staly dostupnějšími s příchodem technik rekombinace DNA a byly použity k demonstraci toho, že cizí geny mohou skutečně napravovat genetické defekty a fenotypy onemocnění v savčích buňkách *in vitro*. Účinné retrovirové vektory a další metody přenosu genů umožnily přesvědčivě prokázat účinnou opravu fenotypu *in vitro* a *in vivo*, což nyní činí z genové terapie široce akceptovaný přístup (Friedmann, 1992).

Klinické testy genové terapie byly zahájeny roku 1990 na dvou dětských pacientech s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID – ADA¹). Podstatou byl transfer genu adenosindeaminázy (ADA) do T-lymfocytů, a to prostřednictvím retroviru. Tato klinická studie vykazovala pozitivní výsledky, a to takové, že u pacientů byl pozorovatelný nárůst T – lymfocytů na optimální hodnoty. Stejně tak došlo k optimalizaci buněčné a humorální imunitní odpovědi. I přesto, že léčba skončila po dvou letech, exprese integrovaného vektoru a genu ADA v T – lymfocytech přetrvala. Touto studií bylo poprvé dokázáno, že genová terapie je bezpečnou a účinnou možností léčby pacientů s tímto závažným imunodeficientním onemocněním (Blaese, Culver, 1995).

Genové terapie pro SCID – ADA byla schválena Evropskou komisí až po 26 letech od první klinické studie – tedy v roce 2016. Jednalo se o genovou terapii *ex vivo* hematopoetickými kmenovými buňkami (zkr. HSC z ang. hematopoietic stem cells). Tento léčivý přípravek nese název Strimvelis™ a jedná se o přípravek pro moderní terapii (ATMP – advanced therapy medicinal product), který byl původně vyvinut v San Raffael Telethon insitutu pro genovou terapii. Tento ATMP je první genovou terapií *ex vivo* s kmenovými buňkami, která získala regulované schválení po celém světě. Samotný léčebný postup pro terapeutikum Strimvelis™ se skládá z jedné infuze autologních HSC s upraveným genem, která je připravena z HSC vlastní kostní dřeně pacienta. Odebrané HSC jsou poté geneticky upraveny pomocí gama-retrovirového vektoru za účelem vložení funkční kopie genu ADA (Aiuti et al., 2017).

Přípravek Strimvelis™ není samozřejmě jediným léčivým přípravkem genové terapie. V současné době se můžeme setkat i s jinými přípravky jako je například Zynteglo, který je určen k léčbě beta talasémie či s přípravkem bb1111 určeným k léčbě srpkovité anémie. O bezpečnosti přípravku Zyntego pro použití v genové terapii bylo zahájeno evropské přehodnocení v roce 2021 (Asghar et al., 2022). Přípravek bb1111 je stále ve fázi vývoje, ale u pacientů, kterým byl tento přípravek podán byl kromě 2 případů leukémie zaznamenán také výskyt myelodysplastického syndromu (Walters et al., 2022).

¹ Vzácná dědičná porucha, způsobená mutací genu ADA, při níž dochází k poškození imunitního systému, což způsobuje úplný nedostatek B-lymfocytů a T-lymfocytů. U osob s ADA-SCID je vysoké riziko vzniku život ohrožujících virových, bakteriálních a plísňových infekcí a některých typů rakoviny. Příznaky ADA-SCID se obvykle objevují před 6. měsícem věku (Samuel, 2021).

2. TRANSPORTNÍ VEKTORY GENOVÉ TERAPIE

Mezi nejdůležitější a zároveň nejobtížnější aspekty genové terapie patří doručení konkrétního genu. Nástroje používané k přenosu genu se nazývají transportní vektory genové terapie. K tomu, aby se daný vektor dostal na správné místo působení, je zapotřebí takový doručovací systém, který dokáže překonat extracelulární bariéry (např. ochrana nukleové kyseliny před degradací), ale i bariéry intracelulární. Ideální vektor pro doručování genů by měl být účinný, specifický, bezpečný a relativně dlouhé životnosti (Zhang et al., 2012).

Transportní vektory genové terapie lze dělit na virové a nevirové. Virové vektory patří mezi účinnější, jejich aplikace je však limitována. Jsou schopny přenášet pouze menší množství DNA, mohou vyvolat imunologickou odpověď, či být onkogenní. Zatímco nevirové vektory nabízejí bezpečnější a levnější způsob přenosu genu a nejsou omezeny velikostí přenášené molekuly DNA, jejich nevýhodou je nízká účinnost transfekce, tedy vnášení cizorodé DNA do eukaryotické buňky. Na poli klinických testů každopádně dominují vektory virové (Rodriguez et al., 2013).

Mezi nevirové vektory řadíme: anorganické částice, syntetické nebo přírodní biologicky odbouratelné částice a fyzikální metody (Rodriguez et al., 2013). Virové vektory pak dělíme dle přenášejího viru, kterým může být například: retrovirus, lentivirus, adenovirus nebo adeno-asociované viry (Warnock et al., 2011).

2.1 NEVIROVÉ TRANSPORTNÍ VEKTORY

Přehled nevirových transportních vektorů uvádí tabulka 1 a vybrané metody jsou popsány v následujících kapitolách.

Tabulka 1; Přehled kategorií nevirových transportních vektorů a konkrétních systémů pro transport genu. Upraveno dle (Lundstrom, 2018).

Kategorie	Systém pro transport genu
Anorganické částice	Oxid křemičitý
	Kalcium fosfát
	Zlato
	Magnetické sloučeniny
Syntetické nebo přírodní biologicky odbouratelné částice	1. nevirové polymerové vektory:
	PLGA (kopolymer kys. mléčné a glykolové)
	PLA (polymer kys. mléčné)
	Chitosan
	Dendrimery
	Polymethakryláty
	2. nevirové kationtové lipidy:
	Kationtové liposomy
	Kationtové emulze
	Pevné lipidové nanočástice
	3. Kationtové peptidy
	Poly-L-lysin
	Fyzikální metody
Balistická injekce DNA	
Elektroporace	
Sonoporace	
Fotoporace	
Magnetofekce	
Hydroporace	

2.1.1 ANORGANICKÉ ČÁSTICE

Anorganické nanočástice patří mezi nanostruktury, které nabývají různé variability ve své velikosti, tvaru a porézności. Mohou být koncipovány tak, aby se vyhnuly retikuloendoteliálnímu systému nebo chránily zachycenou molekulu před degradací nebo denaturací (Pérez-Martínez et al., 2012). Mezi nejvíce studované anorganické částice patří oxid křemičitý, kalcium fosfát, zlato a několik druhů magnetických sloučenin (Rodriguez et al., 2013). Například nanočástice potažené oxidem křemičitým jsou díky své biokompatibilitě využívány nejenom v genové terapii, ale i k dalším biologickým aplikacím (Pérez-Martínez et al., 2012). Mezoporézní nanočástice potažené oxidem křemičitým vykazují účinné genové transfekce *in vitro* v gliových buňkách. Magnetické anorganické částice – jako například Fe_3O_4

či MnO_2 jsou používané jako vektory pro nukleové kyseliny při nádorovém onemocnění. Obdobně lze jako genové vektory využít křemíkové nanotrubičky (Guo, Huang, 2012).

Nanočástice zlata jsou dalším vhodným kandidátem na nevirový vektor, a to díky snadné přípravě, snadné úpravě jejich povrchu a nízké toxicitě (Rodriguez et al., 2013). Zlaté nanotyčinky lze například využít k doručení nukleové kyseliny do nádorů. Tyto nanočástice jsou zkoumány jako fototermální látky *in vivo*. Jejich pásmo absorpce je v infračervené oblasti a takto absorbované světlo jsou schopny konvertovat na tepelnou energii. Světlo v infračervené oblasti může být propuštěno hluboko do tkání, a proto je možné modifikovat povrch tak, aby daná zlatá nanočástice nesla DNA a řízeně ji díky tepelné energii uvolňovala. Vyvolaný fototermální efekt by tedy při cíleném ozařování tkání pomocí zlatých nanočástic uvolnil jednořetězcovou DNA vlivem denaturace (Haine, Niidome, 2017).

2.1.2 SYNTETICKÉ NEBO PŘÍRODNÍ BIOLOGICKY ODBOURATELNÉ ČÁSTICE

Do této skupiny nevirových vektorů řadíme kationtové polymery, kationtové lipidy, kationtové peptidy nebo také kombinaci těchto kationtových komponent. Mezi jejich výhody patří nízká toxicita (jejich degradace vede ke vzniku netoxických produktů) a zároveň nedochází k jejich kumulaci v buňkách. Do této skupiny řadíme přes 14 nosičů (Rodriguez et al., 2013). V dalším odstavci jsem se věnovala jednomu konkrétnímu příkladu.

2.1.2.1 LIPOSOMY

Liposomy jsou kulovité vezikuly z fosfolipidů, které se používají k doručování léků nebo genů. Kationtové liposomy spontánně interagují s molekulami DNA za vzniku komplexů (lipoplexů). Interakce spočívá v reakci mezi kladným nábojem kationtového liposomu a záporným nábojem na molekule DNA. Mezi výhody jejich používání lze zařadit poměrně nízké pořizovací ceny, zdravotní nezávadnost, ochrana DNA před degradací, schopnost transportovat i velké molekuly DNA a možnost zacílení na konkrétní buňky nebo tkáně (Kamimura et al., 2012).

Úspěšný přenos genu nejen DNA, ale i RNA byl zaznamenán u zvířat, a to do různých typů buněk (např. do hepatocytů, svalových buněk apod.), ale i do nádorů. Vektory na bázi liposomů mají své pole působnosti i při klinických studiích pro nádorová onemocnění. Jako konkrétní příklad lze uvést Allovectin-7® - komplex složený z plasmidové DNA s geny HLA-B

a β 2-mikroglobulinem vázané s liposomem DMRIE/DOPE. Tento komplex byl označen za účinný neviróvý transportní vektor v rámci hodnocení 2 klinických testů (Rodriguez et al., 2013).

2.1.3 FYZIKÁLNÍ METODY

Přenos genů pomocí fyzikálních metod představuje jednoduchý a elegantní přenos genetické informace do buňky, aniž by s ním byly vneseny nežádoucí částice nebo viry (Kamimura et al., 2012). Přehled fyzikálních metod uvádí tabulka 1, v následujících odstavcích jsou konkrétněji popsány principy jednotlivých fyzikálních metod.

Injekce jehlou umožňuje vstříkování DNA injekční jehlou přímo do tkání. Tímto způsobem lze přenášet DNA například do svalů, kůže, jater, srdce či solidních nádorů. Účinnost transfekce je ale poměrně nízká, a navíc je omezena na okolí vpichu jehly (Kamimura et al., 2012). Balistická injekce DNA umožňuje přenos DNA pomocí částic zlata nesoucí DNA, které jsou poháněny proti buňkám a jsou tak nuceny k intracelulárnímu přenosu genetické informace. Akcelerace částic zlata je zvýšena elektrickým, jiskrovým nebo tlakovým heliovým výbojem. Výhodou této metody je, že umožňuje dodávat přesné dávky DNA, ale geny se bohužel exprimují pouze přechodně, a navíc v místě výboje dochází ke značnému poškození buněk (Rodriguez et al., 2013).

Elektroporace umožňuje vstup DNA skrze póry v buněčné membráně, které jsou vyvolané elektrickými pulzy. Účinnost elektroporace je závislá na intenzitě pulzů, frekvenci a také délce trvání pulzů (Kumar et al., 2019). Metoda sonoporace je založena na nízkofrekvenčních akustických vlnách, které způsobí dočasnou permeabilitu membrány a vstup DNA do jádra buňky díky protržení jaderného obalu (Rich et al., 2022). Hydroporace je postup rychlé injekce velkého množství DNA v roztoku. Využívá se například u intrahepatálního přenosu genů u hlodavců, kterého se dosáhne vstříknutím velkého objemu roztoku s DNA do ocasní žíly. Nevýhody jsou spjaty s velkými objemy roztoku, které vedou k poškození tkáně. Fotoporace umožňuje vytvoření pórů působením laserového pulzu, což umožní vstup DNA. Účinnost je opět závislá na frekvenci a dá se říci, že míra exprese genů je srovnatelná s metodou elektroporace. Magnetofekce pak využívá magnetické pole k nasměrování komplexu DNA-magnetická nanočástice do buňky, kam tento komplex vstupuje endocytózou. (Rodriguez et al., 2013).

2.2 TRANSPORTNÍ VIROVÉ VEKTORY

Tabulka 2; Přehled významných virových transportních vektorů s konkrétními vlastnostmi, typem genomu a inzertní kapacitou. Upraveno dle (Lundstrom, 2018).

Virus	Genom	Inzertní kapacita	Vlastnosti
Adenoviry Ad5	dsDNA	<7,5 kb	Široká škála hostitelů Tranzistentní exprese Silná imunogenicita
AAV AAV2, 3, 5, 6, 8, 9	ssDNA	<4 kb	Relativně široká škála hostitelů Pomalý nástup exprese Chromozomální integrace Imunitní odpověď
Herpes simplex	dsDNA	>30 kb	Široká škála hostitelů Nízká toxicita Vysoká inzertní kapacita
Retroviry MMSV MSCV	ssRNA	8 kb	Transdukce pouze na dělicí se buňky Dlouhotrvající exprese Náhodné integrace
Lentiviry HIV-1, HIV-2	ssRNA	8 kb	Široká škála hostitelů Dlouhotrvající exprese Nízká cytotoxicita
Alfaviry SFV, SIN VEE, M1	ssRNA	8 kb	Široká škála hostitelů Extrémně přechodná exprese Nízká imunogenicita Vznik specifických neuronových a gliových mutantů
Flaviviry Kunjin, virus západonilské horečky Virus Dengue	ssRNA	6 kb	Relativně široká škála hostitelů Tranzistentní exprese Obalový systém
Rhabdoviry VSV, virus vztekliny	ssRNA	6 kb	Relativně široká škála hostitelů Vysoká tranzistentní exprese Nízká imunogenicita
Morbillivirus MV-Edm	ssRNA	6 kb	Tranzistentní exprese Onkolytické kmeny
Virus newcastleské choroby	ssRNA	6 kb	Replikace v nádorových buňkách Vylepšené onkolytické vektory
Poxviry VV	dsDNA	>30 kb	Relativně široká škála hostitelů Replikačně kompetentní vektory
Picornaviry Coxsackievirus	ssRNA	6 kb	Onkolytické kmeny

Transportní virové vektory patří mezi účinné prostředky přenosu genů pro modifikaci určitého typu buněk nebo tkání (Warnock et al., 2011). Spektrum virálních vektorů je velmi rozsáhlé a zahrnuje nosiče pro expresi jak přechodnou, tak i permanentní. Vektory tohoto typu jsou zastoupeny v DNA i RNA variaci, a to s jednořetězcovým i dvouřetězcovým genomem (Rodriguez et al., 2013). Výběr viru pro rutinní klinické použití závisí na účinnosti exprese transgenů, snadnosti výroby, bezpečnosti, toxicitě a stabilitě (Warnock et al., 2011).

Hlavním důvodem k použití virů jako transportních vektorů pro přenos genů je jejich přirozená schopnost infikovat buňky a účinně přenášet genový materiál do hostitelských buněk. Mezi transportní virové vektory řadíme například adenoviry (Ads), retroviry (γ -retroviry a lentiviry), poxviry, adenoasociované viry, bakuloviry a viry herpes simplex (Warnock et al., 2011). Spolu s dalšími hlavními vektory jsou uvedeny v tabulce 2. Vzhledem k velkému množství virových transportních vektorů se v následujících podkapitolách podrobněji věnuji pouze třem konkrétním případům.

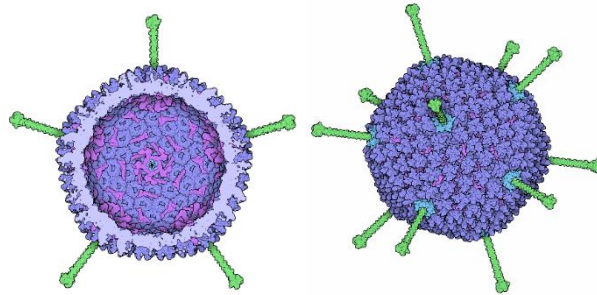
2.2.1. ADENOVIRY

Adenoviry jsou neobalené viry o průměru 70-90 nm mající dvouvláknovou DNA. Jsou tvořeny kapsidou, která má kubickou symetrii a je složena z 252 kapsomér. Kapsida má tvar pravidelného dvacetistěnu, jehož stěny tvoří hexony a vrcholy tvoří pentony. Z pentonů vybíhají vlákna s paličkovitým zakončením. Polypeptid tvořící paličku je nástrojem adsorpce virionů na vnímavé buňky, ale také nositelem typové specifity a hemaglutinačních vlastností adenovirů. Adenoviry mají široké využití na poli genového inženýrství a terapie jako vektor konjugátů různých genů, které mají být včleněny do chromozomů. K dopravě požadovaného úseku DNA do jádra napomáhá schopnost adenovirů pronikat do buňky a vyhýbat se destruktivním účinkům endozomů bez významných ztrát. Samotný transport genu zajišťuje kapsida, která i chrání genetickou informaci viru (Bednář, et al., 1996).

Adenovirové transportní vektory jsou pro funkci transportního vektoru upraveny a jsou replikačně defektní (nejsou schopné replikace). Některé základní virové geny jsou odstraněny a nahrazeny terapeutickými geny. V hostitelské buňce pak dochází k expresi terapeutického genu. V genové terapii rakovinného bujení jsou pak používány onkolytické vektory, které jsou konstruovány tak, aby se přednostně replikovaly v nádorových buňkách a ničily nádorové buňky přirozeným procesem lytické replikace viru (Gadenstaetter et al., 2022).

Jedná se o jeden z prvních zkoumaných a použitých transportních virových vektorů *in vivo*. Použitelných adenovirů existuje přes 50 různých sérotypů, přičemž pro genovou terapii se nejčastěji používají sérotypy Ad5 a Ad26. Zároveň existují 3 generace transportních vektorů pro různé terapeutické využití. První generace Ad umožňuje nést až 7,5 kb cizorodé DNA, druhá generace poskytuje sníženou imunogenicitu a Ad třetí generace mají odstraněny všechny virové geny, což umožňuje nést až 30 kb cizorodé DNA (Zhao et al., 2022).

Adenovirové transportní vektory jsou vhodné pro silnou krátkodobou expresi transgenů, a to v různých typech buněk (Scholz et al., 2022). Své využití nacházejí také v již zmíněné genové terapii rakoviny, či jako vakcíny k expresi cizích antigenů. Adenovirové vektory se také považovaly za vhodné kandidáty k léčbě cystické fibrózy, vzhledem k relativní přístupnosti plic k virovým infekcím. Upravený adenovirový vektor byl ve formě aerosolu inhalován nosem do plic. Pokusy byly prováděny nejdříve na krysách a následně na lidech. V některých případech byly pozorovány pozitivní výsledky a také obnovený transport chloridových iontů, který je v rámci cystické fibrózy porušen. Naneštěstí po 30 dnech docházelo k poklesu exprese, která nebyla posílena ani opakovanými dávkami. Zvýšené či opakované dávky adenovirového vektoru byly rozpoznávány imunitním systémem a destruovány (Clark, Pazdernik, 2012).



Obrázek 1; Struktura adenoviru: kapsida s kubickou symetrií mající tvar pravidelného dvacetistěnu. Z pentonů vybíhají vlákna s paličkovitým zakončením, které jsou nástrojem adsorpce virionů na vnímavé buňky (Goodsell, 2010).

2.2.2 ADENOASOCIOVANÉ VIRY

Adenoasociované viry (AAV) řadíme do skupiny DNA virů, které u člověka nevyvolávají žádné zjevné onemocnění. V populaci se šíří spolu s adenovirovou infekcí a i v hostitelské buňce se replikují pouze paralelně s adenoviry. Není-li přítomen pomocný virus, integruje se genom AAV do buněčného chromozomu a replikace je znovu aktivována až při infekci pomocným virem (Bednář, et al., 1996).

AVV disponují souborem jedinečných vlastností, které z nich dělají vhodné kandidáty pro genovou terapii. Přestože infekce AAV nevyžaduje proliferaci hostitelských buněk, i tak může vykazovat relativní preferenci k aktivně se dělícím buňkám. V genové terapii rozlišujeme AVV na wild-type a transportní adenoasociované virové vektory. Jak wild-type, tak transportní vektory mají tendenci přetrvávat v infikovaných buňkách po delší dobu, aniž by to mělo pro hostitele významné nepříznivé důsledky. Wild-type se často integruje do jedné specifické

oblasti chromozomu 19, zatímco transportní vektory AAV se do genomu hostitelské buňky integrují méně specifickým způsobem a mohou také přetrvávat v episomálním² stavu (Flotte, Carter, 1995).

Adenoasociovaných virů existuje 11 přirozených sérotypů, kdy každý sérotyp poskytuje tropismus vůči různým tkáním, díky čemuž je každý sérotyp vhodný pro doručování genů do specifické tkáně. Například AAV9 vykazuje tropismus k tkáním CNS, AAV8 účinně transdukuje slinivku břišní a AAV6 je hepatotropní (Zhao et al., 2022).

Spektrum využití AVV v genové terapii je poměrně rozsáhlé. Například v rámci testů u hlodavců a primátů při léčbě cystické fibrozy byla pozorována transdukcce a exprese v plicích *in vivo* po přímém podání AVV na povrch dýchacích cest, aniž by byla zjištěna jakákoli toxicita (Flotte, Carter, 1995). Spolu s lentiviry (LV) jako transportními virovými vektory jsou AAV testovány v preklinických studiích jako vhodná vehikula pro léčbu následků ischemické cévní mozkové příhody (Skukan et al., 2022).

Mezi výhody AAV patří také možnost intranazální aplikace. Kromě cílení na místní tkáně, jako je například čichový epitel, umožňuje minimálně invazivní přístup k různým orgánovým systémům, včetně centrálního nervového systému a dýchacích cest. Díky této možnosti podání nachází využití u různých infekčních, plicních nebo neurologických a psychiatrických onemocnění (Gadenstaetter et al., 2022).

2.2.3 RETROVIRY

Částice retrovirů měří v průměru 100-120 nm. Mají lipidový obal, na jehož vnitřní straně je vrstva M-proteinu a ve vrstvě zevní se nachází glykoproteinové výběžky. Kapsida, která se nachází pod lipidovým obalem ohraničuje strukturu zvanou nukleoid. Nukleoid má kulovitý nebo konický tvar. Uvnitř se nachází dvě identická vlákna RNA spojená vodíkovou vazbou. Tato RNA je lineární, nesegmentovaná a obsahuje cca 9500 nukleotidů. Vlákna RNA na sebe váží protein tvořící helikoidální kapsidu a enzym reverzní transkriptázu, která podmiňuje charakteristický způsob replikace retrovirů. Genová informace v molekule RNA (+) je přepisována do DNA (-) s následnou syntézou komplementárního vládna DNA (+). Dvouvláknový transkript putuje do jádra, kde je integrován do buněčné DNA jako tzv. provirus,

² Episomální stav označuje situaci, kdy se extrachromozomální element může buď integrovat do chromozomu hostitele, nebo se může replikovat a stabilně fungovat, pokud je od chromozomu fyzicky oddělen (dalším příkladem episomu jsou plazmidy) (Ryu, 2017).

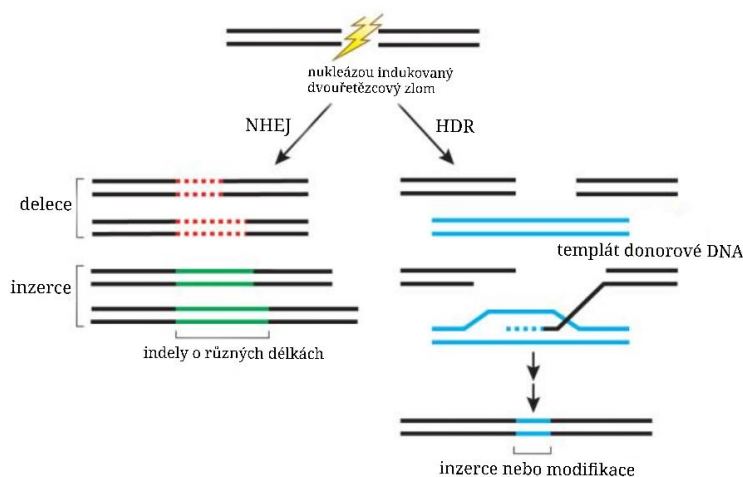
z něhož je opět přepisována virová RNA. Do podčeledi retrovirů řadíme mimo jiné i Lentivirinae, které u člověka označujeme jako viry imunologické nedostatečnosti (HIV) (Bednář, et al., 1996).

Retroviry sehrály centrální úlohu při výzkumu vzniku rakoviny. Přispěly k poznání, že většina druhů rakoviny vzniká mutacemi v malém počtu buněčných genů. U lidí je sice malá pravděpodobnost vzniku rakoviny retrovirovou infekcí, ale u některých živočichů jsou tyto viry hlavní příčinou rakovinného bujení (Alberts, 1998).

Přenos genů pomocí retrovirových vektorů byl klíčový pro rozvoj genové terapie. Retroviry mají oproti jiným vektorům několik výrazných výhod, zejména pokud je preferovaným výsledkem trvalý přenos genu. Retrovirové transportní vektory lze tedy používat pro trvalou modifikaci jaderného genomu hostitelských buněk. Schopnost retrovirů integrovat se do chromozomu hostitelské buňky rovněž zvyšuje možnost inserce mutageneze a aktivace onkogenů. Zvýšená pravděpodobnost mutageneze a onkogeneze nebyla ovšem až donedávna pozorována, a to ani na zvířecích modelech, ani v klinických studiích. Potenciální nevýhody této genové terapie proto byly donedávna považovány za hypotetické. Klinická studie genové terapie X-SCID prokázala potenciál přenosu genů zprostředkovaného retroviry pro léčbu dědičných metabolických onemocnění, avšak ukázala také potenciální nebezpečí, které s tím souvisí, neboť u 2 z 10 pacientů se v důsledku léčby vyvinula T-buněčná leukémie (Anson, 2004). Další nevýhodou u retrovirových vektorů je jejich schopnost integrovat se pouze do dělících se buněk a z toho důvodu nemůže dojít k transdukci v jakékoliv části buněčného cyklu. I přesto, že pro snížení rizika mutageneze byly vyvinuty samo-inaktivační vektory, v dnešních klinických studiích se již tyto transportní vektory moc nepoužívají (Zhao et al., 2022).

3. METODY ÚPRAVY GENŮ

Editace genů je obecně označována jako schopnost provádět vysoce specifické změny v sekvenci DNA živého organismu a upravovat tak jeho genetickou výbavu. Editace genů se provádí pomocí enzymů, zejména restrikčních endonukleáz, které byly vyvinuty tak, aby se zaměřily na specifickou sekvenci DNA. V tomto místě pak enzymy zavádějí řezy do řetězců DNA, což umožňuje odstranění, pozměnění či nahrazení stávající DNA (Gaj et al., 2016). Nukleázy tímto zásahem tvoří dvouřetězcový zlom (zkr. DSB z ang. double-strand break). Tyto zlomy jsou pak nejčastěji opravovány pomocí nehomologního spojování konců (NHEJ – non-homologous end joining) nebo metodou homologně řízené opravy (HDR – homology directed repair). HDR je přesný opravný mechanismus, který lze zprostředkovaně použít k zavedení specifických bodových mutací nebo k vložení požadovaných sekvencí prostřednictvím rekombinace cílového lokusu s exogenně dodanou homologní donorovou DNA (Sander, Joung, 2014). NHEJ umožňuje opravovat místa štěpení bez použití homologních sekvencí (Yoshimi, Mashimo, 2022). Princip spočívá v zavádění různě dlouhých inzertních/delečních mutací, které mohou narušit translační čtecí rámec kódující sekvence nebo vazebná místa trans-aktivačních faktorů (Sander, Joung, 2014).



Obrázek 2; Typy oprav dvouřetězcového zlomu DNA metodami NHEJ a HDR: v případě opravy metodou NHEJ je principem zavádění inzertních/delečních indelů různých délek, zatímco u metody HDR lze cíleně zavádět specifické bodové mutace nebo vkládat požadované sekvence prostřednictvím rekombinace. Upraveno dle (Sander, Joung, 2014).

Dalším postupem v genové terapii může být kromě editace genomu také tzv. „umlčování genů“ (z ang. gene silencing). Jedná se o termín, který obecně popisuje metody genové suprese, tedy metody vedoucí k potlačení genové exprese (McMahon, Rahdar, 2012). Mezi tyto metody lze

zařadit např. RNA interference, antisense oligonukleotidy či microRNA. Například speciální dvouvláknová RNA (dsRNA) je klíčovou molekulou při umlčování genů. Tyto specifické dsRNA jsou zpracovány na malé interferující RNA (siRNA) endonukleázou Dicer a následně jsou vloženy do RNA-indukovaného silencing komplexu, který se páruje s messengerovou RNA (mRNA) prostřednictvím komplementárního párování bází, což způsobí následnou degradaci mRNA pomocí tzv. argonaut proteinů (Im, Moon, 2016). Podrobnému popisu vzniku a působení RNA interferencí je věnována podkapitola v rámci epigenetických úprav.

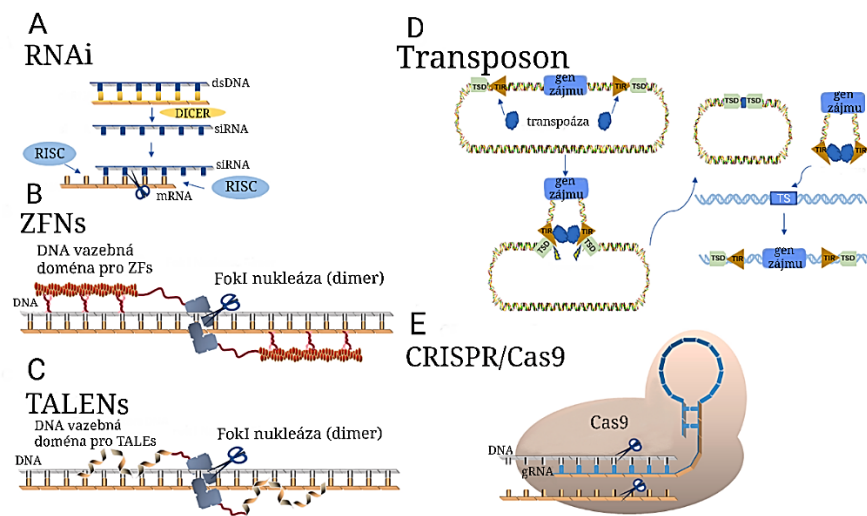
Tabulka 3; Srovnání metod genové terapie: ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9 s konkrétními specifikacemi. Upraveno dle (Im, Moon, 2016).

	ZFNs	TALENs	CRISPR/Cas9
Determinanta specificky cílicí na DNA	Zinc-finger proteiny	Efektory podobné transkripčním aktivátorům	CRISPR RNA či sgRNA
Nukleáza	<i>FokI</i>	<i>FokI</i>	Cas9
Místo restrikce	Poly-G oblast	Začínající T a končící A	Končící NGG či NAG ³ sekvence PAM
Obtížnost daného gen. inženýrství	Obtížné	Středně náročné	Nízká obtížnost
Cytotoxicita	Variabilní až vysoká	Nízká	Nízká
zacílení <i>in vivo</i> pomocí	Virového vektoru	Virového vektoru	Virový vektor, nanočástice

Nejstarší metodou, kterou vědci používali k úpravě genomů v živých buňkách, byla homologní rekombinace. Jedná se o výměnu (rekombinaci) genetické informace mezi dvěma podobnými (homologními) vlákny DNA. Vědci začali tuto techniku vyvíjet koncem 70. let 20. století (Capecchi, 2005). Aby bylo možné provádět homologní rekombinaci v laboratoři, je třeba vytvořit a izolovat fragmenty DNA nesoucí sekvence genomu podobné části genomu, která má být editována. Tyto izolované fragmenty lze vstříknout do jednotlivých buněk nebo je buňky přijmou pomocí speciálních chemikálií. Po vstupu do buňky mohou tyto fragmenty DNA rekombinovat s DNA buňky a nahradit tak cílovou část genomu. Tento typ homologní rekombinace je omezen skutečností, že je ve většině typů buněk extrémně neefektivní. Pravděpodobnost úspěšné editace může být u této techniky až jedna ku milionu (Vasquez et al., 2001).

³ Písmeno N značí jakýkoliv nukleotid (Wu, Kriz, 2014).

V současné době patří mezi nejpoužívanější technologie editace genů metoda CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – Cas, kterou z hlediska evoluční biologie dělíme na třídu I a třídu II a dále je možné ji dělit na několik podtypů. Systémy CRISPR třídy II, včetně Cas9 typu II a Cas12a typu V, se nejčastěji používají k editaci genomu v eukaryotických buňkách. CRISPR typu I rozpoznává delší cílové sekvence než CRISPR-Cas9 a může vyvolat rozsáhlé deleční mutace o velikosti několika kilobází a proto má v současnosti vysoký potenciál na poli genové terapie (Yoshimi, Mashimo, 2022).



Obrázek 3; Vybrané metody genové terapie a jejich obecný princip: RNAi štěpící cílovou mRNA komplexem RISC. Princip působení ZF nukleáz a TALE nukleáz štěpící molekulu DNA pomocí endonukleázy FokI. Transposonový systém vyštěpující gen zájmu za účasti transpoáz a systém CRISPR/Cas9 štěpící molekulu DNA díky proteinu Cas9 a gRNA. Upraveno dle (Zhang et al., 2022).

Mezi další technologie editace genů řadíme metody: ZFN (Zinc-finger nucleases), které jsou vytvořeny z přirozeně se vyskytujících proteinů objevených v eukaryotických organismech. TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), které jsou také vytvořeny z proteinů vyskytujících se v přírodě a které jsou schopny se vázat na specifické sekvence DNA (Klug, 2010) či RNA interference spadající pod epigenetické úpravy.

Právě těmto čtyřem metodám se věnují následující podkapitoly.

3.1. METODA CRISPR

Systém CRISPR je prokaryotický adaptivní imunitní systém nacházející se ve většině archaea a u mnoha bakterií (Makarova, Koonin, 2015). Nukleázy řízené RNA ze systému CRISPR-Cas patří mezi nejspolehlivější nástroje pro editace genomu. Objeveny byly v roce 1987 v genomu *Escherichia coli* při analýze genů zapojených do fosfátového metabolismu. Pozorované repetitivní sekvence DNA byly následně definovány jako CRISPR (z ang. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Podobné sekvenční struktury byly poté zaznamenány i u dalších bakterií a halofilních archeí (Ishino, Krupovic, 2018).

Genomové lokusy CRISPR-Cas vykazují s ohledem na jiné známé prokaryotické obranné systémy nebyvalou složitost a rozmanitost. Klasifikace variant CRISPR-Cas, která odráží jejich evoluční vztahy, je nezbytná pro genomickou a funkční srovnávací charakterizaci tohoto teoreticky i prakticky důležitého adaptivního imunitního systému (Makarova, Koonin, 2015). Díky poznatkům ze srovnávací genomiky, strukturní biologie a biochemie bylo také možné získat poznatky o původu a evoluci tohoto systému z mobilních genetických elementů označovaných jako kaspozony (Ishino, Krupovic, 2018). V evoluční taxonomii jsou systémy CRISPR děleny do 2 tříd, z nichž se každá ještě dělí na 3 typy (typ I, III, IV a typ II, V, VI). Zatímco systémy třídy 1 využívají více různých Cas proteinů, efekторы druhé třídy obsahují pouze jeden protein (Yoshimi, Mashimo, 2022).

Mechanismus tohoto adaptivního imunitního systému spočívá v inkorporaci cizorodé invazivní DNA (virové, plasmidové) do systému CRISPR, tedy mezi nahlučené repetitivní palindromické sekvence. Tento obranný mechanismus probíhá obecně ve třech krocích: získání, exprese a interference invazivní DNA. Během prvního kroku dochází k inkorporaci cizorodé DNA do oblasti CRISPR pomocí proteinů Cas. V následující fázi exprese dochází k transkripci inkorporované invazivní DNA v oblasti CRISPR a vzniku prekurzorových transkriptů pre-CRISPR RNA, respektive pre-crRNA. Tyto prekurzorové transkripty jsou následně štěpeny dalšími proteiny Cas na jednotlivé crRNA (Lee, Bae, 2016). Transkribované crRNA nesou oblasti s protospacery, jež jsou komplementární s cizorodou DNA. Systém CRISPR rovněž kóduje tracrRNA, která hybridizuje s crRNA a tento pár RNA se následně spojuje s nukleázou Cas-9 (Barrangou et al., 2007). V rámci posledního interferenčního kroku komplex Cas-9 nukleáza, crRNA a tracrRNA vyhledává cílové sekvence DNA komplementární k crRNA a následně je štěpí. Nukleáza Cas-9 může být také asociována se sgRNA (z ang. single chain) (Sander, Joung, 2014).

hematologických onemocnění (např. srpkovitá anémie, β -talasemie), genetických svalových onemocnění (např. Duchennova svalová dystrofie) a mnoha dalších (Huang, Zapata, 2022).

Editace genomu *in vivo* za použití metody CRISPR nabízí terapeutické využití u více cílových orgánů, mezi které patří: mozek, vnitřní ucho, srdce, oči a játra. Odpovídajícími cílovými buňkami jsou: neurony, vláskové buňky, kardiomyocyty, fotoreceptory a hepatocyty. V rámci těchto cílených terapií probíhají studie například na léčbu Alzheimerovy choroby, Huntingtonovy choroby, syndromu fragilního X, autozomálně dominantní ztráty sluchu, infarktu myokardu či hypercholesterolemii (Huang, Zapata, 2022).

Huntingtonova choroba (HD) je prototypem pro neurodegenerativní onemocnění u kterých nastává porucha trinukleotidových repetit. U těchto patologických stavů se polyglutaminové oblast protáhne nad určitou mez a způsobí onemocnění. Mezi další onemocnění s tripeptidovou repeticí lze zařadit autozomálně dominantní mozečkové ataxie. Jedná se o poruchy s trinukleotidovými repeticemi, u nichž dochází k hromadění abnormálních proteinů (Kordasiewicz et al., 2012). Hromadění abnormálních – chybně složených proteinů je patologickým rysem i pro další onemocnění, jako jsou Parkinsonova choroba (PD), Alzheimerova choroba (AD) či amyotrofická laterální skleróza, pro které je zároveň také typický sporadický začátek a multifaktoriální etiologické faktory. Právě genové inženýrství se jeví jako účinná léčebná strategie, díky níž lze upravovat tvorbu abnormálních proteinů a zabránit jejich hromadění. Některé pohybové poruchy se dědí autozomálně recesivně, což může být způsobeno sníženou schopností organismu mutovat dané defektní geny. Vzhledem k tomu, že CRISPR/Cas9 dokáže vyřadit specifický transgen, mohou být tyto autozomálně recesivní pohybové poruchy také dobrým cílem pro použití CRISPR/Cas9 (Im, Moon, 2016).

Konkrétní postup použití metody CRISPR u Alzheimerovy choroby, již zmíněného neurodegenerativního onemocnění, je popsán níže. Toto onemocnění je charakterizováno intracelulárními neurofibrilárními klubky a extracelulárními plaky obsahujícími β -amyloid (zkr. A β) (Knopman et al., 2021). Mnoho pacientů s Alzheimerovou chorobou má poruchy krátkodobé paměti, vyjadřování, vizuoprostorového zpracování a kognitivních funkcí. Ve většině případů AD se genetická složka nedědí dominantně, ale i přesto hraje dědičnost v komplexní roli. β -sekretáza 1 (kódována genem Bace1) je nezbytná pro produkci peptidů A β , a proto se jako potenciální terapeutická strategie nabízí cílené narušení genu Bace 1 (Kang et al., 2012).

V roce 2019 byl v rámci studie této terapeutické strategie použit systém CRISPR-Cas9 zaměřený na gen *Bace1* v postmitotických neuronech. Cílem bylo snížit výskyt patologií spojených s $A\beta$ a také snížit výskyt kognitivních deficitů u dvou transgenních myších modelů s AD. Komplex Cas9-sgRNA cílený na *Bace1* byl za vzniku nanokomplexu spojen se syntetickým peptidem R7L10. Tyto nanokomplexy Cas9-sgRNA-R7L10 byly aplikovány do hipokampální oblasti pěti myší s familiární AD (5XFAD). Po čtyřech týdnech došlo u myší ošetřených nanokomplexem k 70% redukci *Bace1* a zároveň došlo k významnému snížení štěpných produktů β -amyloidového prekursorového proteinu. Fenotyp AD u myší 5XFAD byl léčbou pomocí nanokomplexu Cas9-sgRNA-R7L10 potlačen, což se projevilo snížením akumulace plaků $A\beta$ a sekrece $A\beta_{42}$. Studie myšího chování ukázala, že myši léčené nanokomplexem měly zvýšené asociativní učení a zároveň u nich byly zmírněné poruchy paměti. U druhého modelu myší s AD byly patologie spojené s $A\beta$ a kognitivní deficity rovněž úspěšně potlačeny (Park et al., 2019).

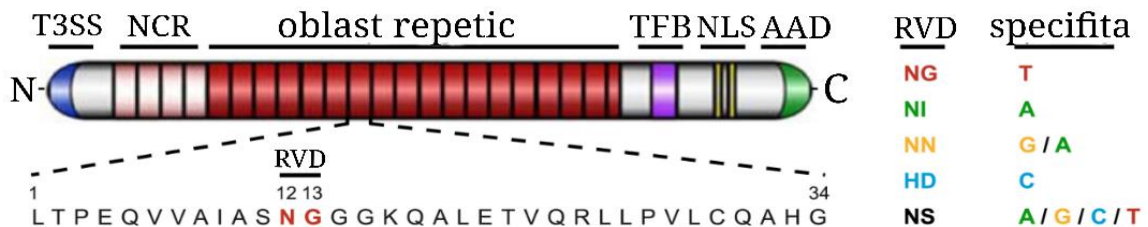
V rámci studie byly zkoumány také účinky mimo cíl (off-target) a při použití zmíněného nanokomplexu nebyly zaznamenány žádné rozsáhlé genomové přestavby ani změny počtu kopií. Tyto výsledky naznačují, že Cas9-sgRNA-R7L10 neindukuje zvýšenou míru mutací ani nezpůsobuje změny v celogenomovém měřítku. Celkově lze říci, že nanokomplex Cas9-sgRNA-R7L10 je účinný při cílení na hipokampální neuronální gen *Bace1* *in vivo* a při zmírňování patologií a chování souvisejících s $A\beta$ (Park et al., 2019).

Tato studie je příkladem přizpůsobení editace genomu pomocí CRISPR-Cas9 k léčbě neurologických poruch a poskytuje potenciální přístup k zásahu do případného nástupu kognitivních poruch u pacientů s AD (Park et al., 2019).

3.2. METODA TALENs

Transkripčním aktivátorům podobné efekторы (zkr. TALE z ang. Transcription activator-like effectors) jsou proteiny patogenních rostlinných bakterií *Xanthomonas*, které jsou přenášeny pomocí sekrečního systému typu III (T3SS) (XU et al., 2017). Tyto proteiny jsou vstříkovány do rostlinných buněk, kde se lokalizují v jádře, vážou se na cílové promotory a indukují genovou expresi. Konkrétním proteinem je například AvrBs3 u rostlin, který po interakci s jádrem indukuje expresi hlavního regulátoru velikosti buněk – *upa20* a způsobuje tak hypertrofii mezofylových buněk rostlin (Kay et al., 2007).

Proteiny TALE jsou charakterizovány N-koncovým signálem T3SS, centrální tandemovou opakující se doménou, C-koncovými jadernými lokalizačními signály (zkr. NLS z ang. nuclear localization signal) a kyselou transkripční aktivační doménou (Gao et al., 2012). V jejich N-koncové doméně se nachází bakteriální sekreční signál a nespecifická DNA vazebná aktivita, která je nezbytná pro obecnou afinitu proteinu k DNA. C-koncová doména v sobě kotví interakční rozhraní pro rostlinný transkripční faktor IIA, dva funkční jaderné lokalizační signály a kyselou aktivační doménu. Klíčem k jejich specifické a programovatelné vazbě na DNA je centrální oblast dlouhých tandemových repetic, která se skládá z různého počtu aminokyselin, kterých obvykle bývá 33-35. V DNA vazebné doméně, která obsahuje modulární repetice platí, že se každý monomer váže na jednu bázi v cílové DNA. Počet a pořadí repetic ve vazebné doméně DNA se liší a určuje vazebnou specifitu pro sekvenci DNA. Dvě aminokyseliny, které určují DNA specifitu TALE, se nacházejí v poloze 12 a 13 každé repetice a tvoří tzv. variabilní di-rezidua repetice (RVD z ang. repeat-variable di-residues) (Becker, Boch, 2021).



Obrázek 5; Protein TALE s vyznačenou oblastí repetic, kde 12. a 13. aminokyselina určují vazebnou specifitu TALE. Tato specifita je uvedena v levém sloupci obrázku. Oblast NCR (non-canonical repeats) je oblast 4 nepravidelných repetic, TFB (transcription factor binding site) ukazuje na oblast navázání transkripčního faktoru, NLS (nuclear localization signals) je oblast 2 jaderných lokalizačních systémů a AAD (acidic activation domain) ukazuje tzv. acidickou aktivační doménu. Upraveno dle (Becker, Boch, 2021).

Nukleázy TALE (TALEN) odstartovaly evoluci v editaci genomu, jelikož patřily mezi první zařízení, které bylo možné relativně snadno navrhnout a sestrojít tak, aby je bylo možné zacílit na jakýkoliv konkrétní genomový lokus, a to s vysokou přesností a účinností. Byly vyvinuly v roce 2010 a to fúzí TALE a katalytické domény restriční endonukleázy FokI vázané buď na N-konec, nebo na C-konec TALE. Jejich použití bylo mnohem jednodušší než u jejich předchůdců. Do buněk lze TALEN přenášet různými způsoby, mezi které patří: injekce/elektroporace v rámci fyzikálních metod, doručení pomocí bakteriálního plazmidu, doručení virovým vektorem či doručení ve vazbě na liposomy/PEG v rámci metod chemických (Becker, Boch, 2021).

3.2.1. VYUŽITÍ V GENOVÉ TERAPII

Nukleázy TALE našly své uplatnění v editaci genomu plodin, hospodářských zvířat i řady dalších modelových i nemodelových organismů. Následně se technologie TALEN stala nástrojem pro editaci lidského genomu a úspěchu dosáhla například v roce 2015 při terapii lymfoblastické leukémie (Becker, Boch, 2021). V rámci této léčebné terapie byly použity dárcovské T-lymfocyty, které byly upraveny tak, aby na svém povrchu exprimovaly CAR19 – chimérické antigenní receptory, které jsou zacíleny proti rakovinným buňkám. Tyto T-lymfocyty byly upraveny transdukcí, a to za použití lentivirů. Zároveň byly editovány geny řetězce a receptoru T-lymfocytu a genového lokusu CD52. Tato léčba byla aplikována na dvě děti s akutní lymfoblastickou leukémií B-lymfocytů (s povrchovými znaky CD 19+) u nichž docházelo k relapsu onemocnění. Byla jim podána lymfodeplační chemoterapie a séroterapie anti-CD52, po níž následovala infuze jedné dávky buněk UCART19. U obou dětí bylo dosaženo molekulární remise během 28 dnů a buňky UCART19 přetrvávaly až do úspěšné alogenní transplantace kmenových buněk (Qasim et al., 2017).

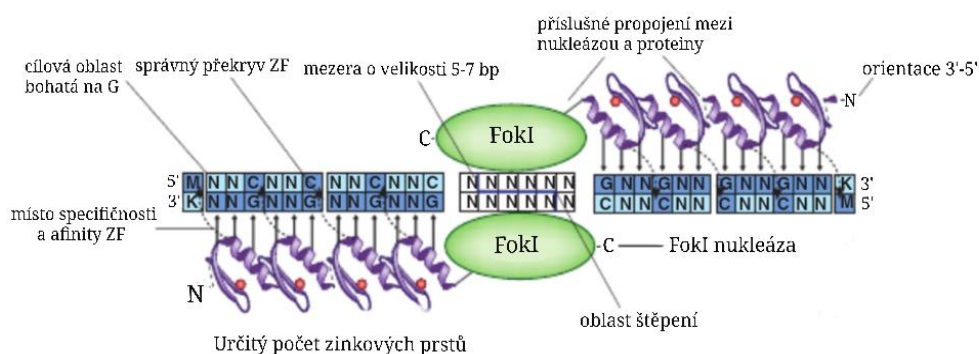
Své uplatnění mají nukleázy TALE také ve studiích zabývajících se hledáním terapeutických nástrojů k léčbě infekce virem HIV. TALENs mají méně off-target editace a mohou být účinnější při tolerování únikových mutací HIV než CRISPR/Cas-9. Vědci zkoumali editování hostitelských genů pomocí TALEN, jako jsou vstupní receptory viru (CCR5 a CXCR4) a proteiny zapojené do provirové integrace (LEDGF/p75). Mezi cílové virové struktury, na které jsou nukleázy TALE zaměřeny patří provirová DNA, a to zejména se zaměřením na dlouhé terminální repetice. Hlavními výzvami při zavádění genové terapie je zlepšení účinnosti štěpení a doručení a zároveň minimalizace editace off-target, cytotoxicity a imunogenicity (Benjamin et al., 2016).

3.3. METODA ZFNs

Zinkové prsty (zkr. ZFN z ang. zinc fingers nucleases) jsou malé proteinové podjednotky se strukturovanými peptidovými řetězci, které se skládají kolem iontů Zn^{2+} . Zinečnaté ionty v tomto uspořádání slouží především jako stabilizátory struktury, a ne jako enzymatický kofaktor, jak je pro Zn^{2+} běžné. Funkčně tyto podjednotky plní v buňkách širokou škálu úkolů tím, že poskytují stabilní strukturní podporu a řídí kritické vazebné interakce, zejména mezi proteiny, DNA a RNA. Zinkové prsty jsou zvláště důležité v genové regulaci, kde je mnoho proteinů využívá ke specifické vazbě na DNA, čímž aktivují nebo inhibují určité geny. Ačkoli existuje mnoho rodin zinkových prstů, z nichž každá má charakteristické složení nebo strukturu, pravděpodobně nejlépe prozkoumaný je tzv. klasický typ (Cys2-His2). Klasické zinkové prsty jsou mimořádně univerzální, o čemž svědčí jejich hojný výskyt v přírodě: jen v lidském genomu je obsahuje více než 700 proteinů (Isalan, 2013).

ZFN byly objeveny roku 1985 v transkripčním faktoru IIIA živočišného druhu *Xenopus laevis* (drápatka vodní). Bylo zjištěno, že studovaný transkripční faktor obsahuje ve své sekvenci soubor devíti malých, nezávisle na sobě poskládaných minidomén vázajících zinek. Každá z těchto minidomén má přibližně 30 aminokyselin, které podle názoru objevitelů Millera, McLachlana a Kluga společně zprostředkovávají sekvenčně specifickou vazbu proteinu na DNA. Ve své studii navrhli, že každý z těchto motivů drží pohromadě dva cysteiny a dva histidiny v konzervovaných místech sekvence, které společně vážou jeden zinečnatý ion s tetraedrickou geometrií (Neuhaus, 2022).

ZFN fungují jako dimery, přičemž každý monomer se skládá z DNA vazebné domény (zinkový prst) sloučené s katalytickou doménou restrikčního enzymu FokI. Dvě pole zinkových prstů jsou konstruována tak, aby rozpoznávala cílové sekvence v genomu (každá obvykle 9-12 bp), které jsou odděleny distanční sekvencí (obvykle 5-7 bp). Vazbou této soustavy zinkových prstů na cílovou sekvenci umožňuje FokI dimerizovat a vytvořit dvouřetězcový zlom uvnitř spaceru (Christian et al., 2010). Indukovaný zlom lze použít k editaci genů dvěma různými způsoby. Jedná se o homologní rekombinace (HR) nebo nehomologní spojování konců (NHEJ). NHEJ je často nepřesná a vytváří lokalizované inserce a delece, což může být dostačující v případech, kdy je cílem inaktivace genu. Pro dosažení typu náhrady sekvence, který se obvykle považuje za cílení genu, se spolu s ZFN dodává dárcovská DNA, která je z velké části homologní s cílovou, ale nese specifickou požadovanou změnu sekvence. Když HR použije tohoto dárce jako šablonu, změna se začlení do cíle (Carroll, 2008).



Obrázek 6; Struktura proteinů ZF a dimerní restriční endonukleázy FokI navázané na dsDNA. Na obrázku je také vyznačeno místo specifičnosti a afinity ZF, oblast štěpení a příslušné propojení mezi nukleázou a proteiny. Upraveno dle (Isalan, 2012).

3.3.1. VYUŽITÍ V GENOVÉ TERAPII

Jedna z klinických studií *in vivo* na lidech probíhala v roce 2017 a měla za cíl léčit genovou terapií mukopolysacharidózu typu I/II (zkr. MPS I/II) a hemofilii B – tedy onemocnění pro které je typický nedostatek specifických proteinů. Terapie spočívala v jednorázovém intravenózním podání ZFN, jejichž transportními vektory byly 3 rekombinantní adenoasociované viry (AAV6 – sérotyp 6). Cílovým orgánem pro tuto terapii byla játra, protože jsou centrálním orgánem metabolismu s vysokou syntetickou kapacitou a využívají albuminový promotor k řízení exprese dárcovského genu. Hepatotropní sérotypy AAV, jako je právě AAV6, se používají na základě jejich spolehlivého jaterního tropismu a zároveň se u nich předpokládá, že zajistí dlouhodobou expresi v hepatocytech (Harmatz et al., 2022).

V rámci této klinické studie bylo cílem vyhodnocení bezpečnosti, snášenlivosti a účinnosti systémového podávání terapie pomocí ZFN *in vivo* za účelem dodání enzymu iduronidázy k léčbě MPS I, enzymu iduronát-2-sulfatázy k léčbě MPS II a faktoru IX k léčbě hemofilie B. Ve studiích MPS byla dodávka enzymů spojena se snížením celkové hladiny glykosaminoglykanu (GAG), heparan sulfátu (HS) a dermatan sulfátu (DS) v krvi. Právě zvýšené hladiny glukosaminoglykanů jsou typické pro toto onemocnění, a to z důvodu nefunkčního enzymu, který by měl tyto molekuly fyziologicky štěpit. Ve studii zabývající se hemofilii B bylo u pacientů podávání faktoru IX spojeno se zvýšením hladiny tohoto faktoru, a tedy došlo ke snížení epizod krvácení (Harmatz et al., 2022).

V rámci studií zinkových prstů byly také odhaleny spojitosti mezi aberantní expresí proteinů zinkových prstů a zvýšenému riziku rozvoje nádorového bujení. Konkrétním příkladem je nadměrná exprese ZKSCAN3 (neboli ZFN309), která byla zaznamenána u invazivních kolorektálních karcinomů. Bylo zároveň prokázáno, že knock-down ZKSCAN3 u buněk kolorektálního karcinomu inhibuje růst tohoto tumoru. Následné studie ZKSCAN3 ukázaly, že transkripčně aktivuje integrin $\beta 4$ a vaskulární endoteliální růstový faktor, které se podílejí na kolorektální tumorigenezi. Nadměrná exprese ZKSCAN3 byla zároveň zaznamenána u mnohočetného myelomu či karcinomu prostaty (Jen, Wang, 2016).

Na myších modelech byly také úspěšně aplikovány mitochondriálně cílené nukleázy se zinkovými prsty (mtZFN) pro degradaci mutantní mtDNA pomocí specifického štěpení DNA. Mitochondriálně cílené ZFN byly dodány pomocí AAV a jejich použitím došlo k redukci mutantní mtDNA a zlepšení molekulárních a biochemických fenotypů (Pinheiro, A. Gammage, Minczuk, 2020).

4. EPIGENETICKÉ ÚPRAVY

Epigenetiku lze definovat jako dědičné změny v genové expresi, které na rozdíl od mutací nezpůsobují změny v sekvenci DNA. Mezi epigenetické mechanismy řadíme metylaci DNA, modifikaci histonů, remodelaci chromatinu či ncRNA (z ang. non-coding RNA, tedy nekódující RNA). Pro epigenetické úpravy je také typická mitotická i meiotická dědičnost, tedy že jednotlivé epigenetické změny se mohou přenášet do dalších generací. Epigenetické regulace také prokazatelně ovlivňuje strava a vlivy prostředí, což vysvětluje korelace mezi životním stylem a rozvojem onemocnění. Na rozdíl od genetických změn, které je těžké zvrátit, jsou epigenetické aberace snadněji upravitelné pomocí farmaterapeutik (Zhang, Lu, Chang, 2020). Epigenetika je jedním z vysvětlení proč jsou některé druhy s totožnou DNA fenotypově odlišné (Hamilton, 2011).

Epigenetické úpravy se podílejí na komplexním a reverzibilním souboru modifikací nukleozomu, tedy na úpravách nukleových kyselin a histonů. Všechny úpravy jsou katalyzovány enzymy zvané „writers“, které dokáží vázat široké rozmezí ligandů (od methylové skupiny až po proteiny jako ubiquitin). Vazbou těchto ligandů dochází jednak k ovlivnění afinity mezi DNA a histony, ale také k iniciaci aktivity spolupracujících makromolekul jako jsou například ncRNA a chromatinové remodelátory. Další skupinou epigenetických proteinů jsou „readers“, které umožňují vazebné interakce ve čtecí doméně, která rozpoznává specifické rysy modifikovaných nukleových kyselin a proteinů. Poslední skupinou jsou proteiny zvané „erasers“, což jsou proteiny katalyzující odstraňování zapisovaných změn, čímž je zajištěna reverzibilitnost epigenetických mechanismů. Právě na všechny 3 rodiny proteinů (writers, readers, erasers) lze cílit léčba nízkomolekulárními inhibitory (Ganesan et al., 2019).

V následujících podkapitolách jsou rozebrány vybrané epigenetické úpravy a možnosti aplikace v genové terapii.

4.1. METHYLACE DNA

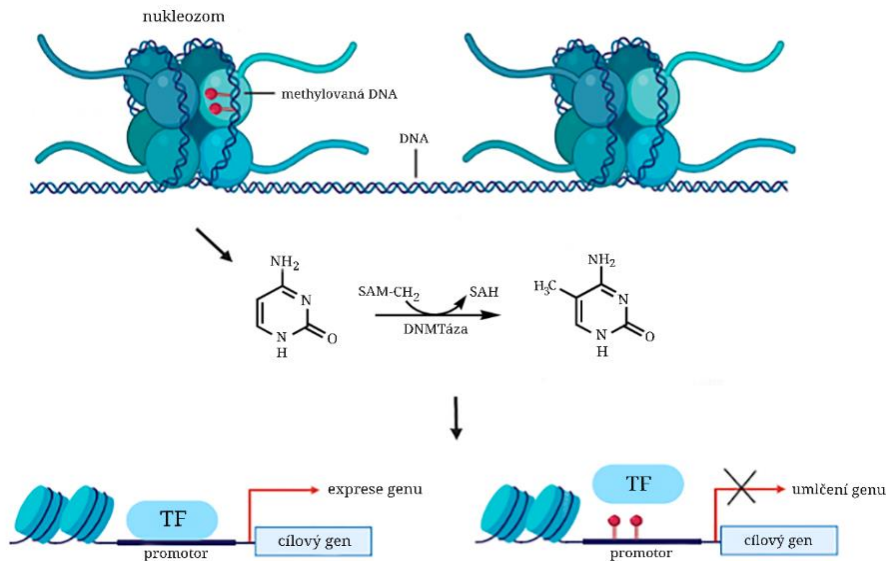
Methylace DNA je jednou z hlavních epigenetických modifikací, která umožňuje kontrolu nad genovou expresí, DNA konformací a DNA stabilitou (Wang, Wu, 2018). Je důležitá pro fyziologický vývoj jedince a hraje svou roli také v genovém imprintingu či změně chromatinu na kondenzovanější formy. Samotná methylace je založena na přenosu methylové skupiny na pátý uhlík cytosinového kruhu za vzniku 5-methylcytosinu v rámci dinukleotidu cytosin-guanin. Tento přenos umožňují kombinovaně 3 methyltransferázy: DNMT1, DNMT3A a DNMT3B jejichž substrátem je S-adenosylmethionin (SAM). Zatímco DNMT1 je zodpovědná za udržování methylace a methylaci hemi-methylované DNA, DNMT3A i B jsou zodpovědné za methylaci DNA tzv. de novo (Mittelstaedt et al., 2021).

Demethylace DNA probíhá pomocí translokačních proteinů TET (z ang. ten-eleven translocation proteins) a aktivačně indukované cytosindeaminázy AID (z ang. activation-induced cytosine deaminase). Demethylace proteiny TET probíhá oxidativní přeměnou 5-methylcytosinu. Můžeme říci, že množství methylované DNA je nepřímo úměrné transkripční aktivitě, a tedy že transkripčně neaktivní geny bývají vysoce methylované a naopak. Methylací dochází také k ovlivnění transkripčních faktorů (aktivně blokuje vazbu TF na promotor) a RNA polymerázy, což vede ke zmiňované modulaci genové exprese (Mittelstaedt et al., 2021).

V rámci methylace DNA může ovšem dojít k hypo či hypermethylaci, které mívají za následek nežádoucí tumorigenezi. Konkrétními případy jsou hypermethylovaný gen BRCA1, který se podílí na opravě dvouřetězcových zlomů a který byl zjištěn u karcinomu vaječníků a prsu. Mimo to se hypermethylace podílí i na agresivitě nádorů díky umlčování genů zapojených do buněčné adheze, či na progresivitě nádorů díky umlčování genů mající proapoptické funkce (Martisova et al., 2021).

Hypomethylace je poté často spojena se zvýšeným poškozením DNA, dekondenzací chromatinu a nestabilitou chromozomů. Zároveň bylo pozorováno, že hypomethylace DNA může aktivovat geny, které byly umlčeny hypermethylovaným promotorem. Jedná se například o geny z genového klastru MAGEA (z ang. melanoma-associated antigen A), které jsou exprimovány pouze ve spermatogoniích, a nikoliv v jiných somatických buňkách. Důsledkem demethylace jejich promotorů mohou být geny opět exprimovány což lze pozorovat u řady nádorů. Abnormální exprese genů MAGEA je spojena se zvýšenou agresivitou a malignitou nádorů prsu, plic a tlustého střeva. Dalším příkladem je progresse prekancerózních lézí z důvodu

postupné demethylace promotoru HPV E6, který v konečném výsledku vede k rozvoji karcinomu děložního čípku (Martisova et al., 2021).



Obrázek 7; Strukturní pohled na metylaci DNA a její funkci: po methylaci promotoru dochází k umlčení cílového genu. Methylace je uskutečněna pomocí DNMT a na obrázku je znázorněna změna struktury. V případě, že nedojde k methylaci DNA, neodchází ani k umlčení cílového genu a gen se nadále exprimuje. Upraveno dle (Sales et al., 2021).

4.1.1. VYUŽITÍ V GENOVÉ TERAPII

Léčiva cílená na epigenetické modifikace jsou většinou založena na inhibici/aktivaci methyltransferáz. V této kapitole popíšou vybraná léčiva a jejich klinické využití. Souhrn dalších léčiv a jejich cíle působnosti uvádí tabulka 4.

Tabulka 4; Seznam epigenetických léčiv, jejich efektů a cílové onemocnění. Upraveno dle (Ciechomska et al., 2019).

Terapeutikum	Epigenetický efekt	Cílené onemocnění
Azacitidin (5'-AZA)	inhibice DNMT	Revmatoidní artritida (RA), myelodysplastický syndrom (MDS)
Decitabin	inhibice DNMT	RA, osteoporóza, chronická myeloidní leukémie
Zebularin	inhibice DNMT	autoimunitní/chronické záněty, MDS
RG108	inhibice DNMT	Rakovina prostaty, prsu, kolorektální karcinom
Procain	inhibice DNMT	Karcinom žaludku, systémová sklerodermie
Hydralazin	inhibice DNMT	RA, rakovina děložního čípku
SGL-1027	inhibice DNMT	Rakovina jater (hepatom)
Budesonid	aktivace DNMT	Rakovina plic
AGI-5198	inhibice DNMT	Tumory v mozku
HMS-101	inhibice DNMT	Akutní myeloidní leukémie

5'-AZA patří spolu s decitabinem a zebularinem do skupiny léčiv jejichž struktura je odvozena od nukleosidů a všechna tato léčiva byla schválena FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) k léčbě různých druhů rakovin. Konkrétněji například 5'-AZA je analogem cytidinu u něhož je pátý uhlík pyrimidinového kruhu substituován dusíkem. Do buněk je importován nukleosidovými transportéry a následně je aktivován uridin-cytidin kinázou. Pouze 20 – 40 % podané dávky se inkorporuje do DNA a indukuje hypomethylaci během buněčné replikace, zatímco 60 – 80 % je včleněno do RNA a ovlivňuje metabolismus proteinů. I přes jeho účinnost má bohužel 5'-AZA také nežádoucí účinky, mezi které patří gastrointestinální toxicita a poléková cytopenie. Tato toxicita nakonec převážila pozitivní účinky a pro léčbu MDS se již využívají jiná léčiva – jako například cytarabin (Griffiths, Gore, 2013).

Nadále se 5'-AZA zkoumá jako inhibitor methyltransferáz pro léčbu osteoporózy a revmatoidní artritidy. V rámci studií bylo provedeno profilování methylace DNA kloubních chondrocytů, kdy hladiny exprimované mRNA byly zjišťovány pomocí real-time PCR. Kladný výsledek, tedy hypomethylace DNA byla pozorována u genů TRAF1 (z ang. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1), CTGF (z ang. connective tissue growth factor) a CX3CL1 (z ang. chemokine (C-X3-C motif ligand 1) na které má tedy 5'-AZA terapeutické účinky (Zhao et al., 2017). Dalším z inhibitorů, který nabízí v rámci klinických studií pozitivní výsledky je terapeutikum decitabin, které bylo zkoumáno na pacientech s myelodysplastickým syndromem. V rámci třetí fáze klinických testů toto léčivo sice vykazovalo vyšší pravděpodobnost přežití bez progresu, ale zároveň u pacientů nevykazovalo pozitivní vliv na celkového přežití (Lübbert et al., 2016).

Mezi novou třídu relativně stabilních léčiv na bázi chinolinu patří SGI-1027, který je jako nízkomolekulární inhibitor DNMT1, DNMT3A a DNMT3B schopen reaktivovat nádorové supresorové geny. Kromě samotné inhibice methyltransferáz také dokáže indukovat degradaci DNMT1. Samotný princip působení SGI-1027 zatím není zcela znám, každopádně léčba tímto terapeutikem je zacílena na hepatocelulární karcinom. V rámci studie bylo prokázáno, že léčba tímto přípravkem vedla k významnému poklesu životaschopnosti buněk, a to v závislosti na dávce. V rámci confirmace, že lék vyvolává apoptózu buněk byla analyzována celodenní léčba, tedy léčba v průběhu 24 hodin. Buňky po apoptóze byly detekovány průtokovým cytometrem a apoptické změny jader byly detekovány fluorescenční mikroskopií. Zároveň byla provedena imunoblotová analýza, která prokázala, že terapeutikum SGI-1027 snížilo expresi

B-buněčného lymfomu a zvýšilo expresi Bcl-asociovaného proteinu X (zkr. BAX⁵), což také prokázalo, že apoptóza je navozena prostřednictvím mitochondriální dráhy (Sun et al., 2018).

Lze předpokládat, že validace epigenetických biomarkerů bude přínosná jak pro diagnostiku, tak i pro prevenci pacientů s nádorovými i nenádorovými onemocněními. Vývoj klinických studií také umožňuje identifikaci biomarkerů, které dokáží předpovídat odpověď organismu na podané léčivo a zabránit tak zbytečným nežádoucím účinkům léčiv, které se podávají pacientům, jejichž nádor je nakonec necitlivý a nereaguje na léčbu. K predikci odpovědi organismu na léčbu mohou být použity jak epigenetické mutace, tak mutace epigenetických enzymů, a to u různých druhů rakovin. Jako příklad lze uvést epigenetické umlčení genu kódující MGMT (O-6-methylguanin-DNA methyltransferáza), které se využívá jako biomarker k predikci odpovědi organismu na temozolomid, což je terapeutikum určené k léčbě glioblastomu (Ganesan et al., 2019).

4.2. RNAi

RNA interference jsou nekódující sekvence RNA, které patří mezi obranné mechanismy organismu chránící před invazí exogenních genů. Nejvýznamnějšími RNA interferencemi jsou siRNA (z ang. small interfering RNA) a miRNA (z ang. microRNA), které dokáží zabránit expresi cílových genů díky zprostředkované degradaci mRNA (siRNA i miRNA) či díky potlačení translace mRNA (miRNA). Zatímco siRNA obvykle vyvolává účinnější a specifitější umlčování genů (gene silencing), miRNA dokáže kompromitovat několik různých cílových genů současně. Právě siRNA, miRNA a ASOs⁶ (antisense oligonukleotidy) jsou příkladnými molekulami, které lze využít k inhibici exprese. Naopak mRNA, saRNA (z ang. small activating), plasmidová DNA či systém CRISPR/Cas cílí na zvýšení genové exprese či na korekci exprese cílového genu (Hu et al., 2020). Mezi další nekódující RNA řadíme mimo siRNA a miRNA například: snoRNA (z ang. small nucleolar RNA), piRNA

⁵ Proteiny rodiny Bcl-2 jsou klíčové při navození apoptózy. Tato rodina se skládá z více než 20 různých homologů, které jsou jak proapoptické (BAX, BAK, BOK), tak antiapoptické (Bcl-2, BclX_L). Tyto proteiny vzájemně tvoří homo/heterodimery a jsou schopny tvořit iontové kanály a permeabilizovat mitochondriální membránu a zároveň umožňují uvolnění cytochromu c, faktoru indukující apoptózu apod., což vede k aktivaci kaspáz (Dastghaib et al., 2021).

⁶ ASOs jsou krátké oligonukleotidy o délce 10–30 nukleotidů, které se přes komplementaritu bází váží na buněčnou RNA a ovlivňují splicing pre-mRNA, stabilitu mRNA a také transkripci nebo interakci RNA a proteiny. Sekvenční specifita vazby ASO poskytuje vysokou specifitu a nízkou míru vedlejších účinků pro ASOs genová terapeutika. Své využití mají antisense oligonukleotidy například při cílené léčbě vývojových neurologických poruch (př. spinální muskulární atrofie a tomu příslušný gen *SMN2*) (Hill, Meisler, 2021)

(PIWI-asociované RNA), tel-sRNA (z ang. telomere specific small RNA) a či rasiRNA (z ang. repeat-associated short interfering RNA) atd. (Kim, Reitmair, 2013).

V následujících podkapitolách více popíši siRNA a miRNA, jejich mechanismus a využití pro genovou terapii.

4.2.1. miRNA

Jak již bylo zmíněno, miRNA jsou malé nekódující molekuly RNA, které potlačují genovou expresi jak inhibicí translace proteinů, tak cílenou degradací mRNA. Od jejich objevu roku 1993 v *Caenorhabditis elegans* bylo popsáno několik set druhů miRNA, ale obecně lze říci, že průběh biogeneze začíná v jádře a končí v cytoplazmě (Ho et al., 2022).

Vznikají transkripcí zprostředkovanou především RNA polymerázou II a následně jsou posttranskripčně upraveny – dochází ke splicingu (sestříhu) a polyadenylaci. Těmito kroky vzniká primární miRNA (pri-miRNA), která je následně v jádře naštěpena RNAázou Drosha/DGCR8 na 70 až 100 nukleotidů dlouhé molekuly pre-miRNA, které jsou transportovány do cytoplazmy přes jaderné póry díky Exportinu-5 (XPO5). V cytoplazmě dochází k dalšímu štěpení za účasti endoribonukleázy Dicer, která štěpí dvouvláknovou pre-miRNA na miRNA. Enzym helikáza následně tuto dsRNA rozplétá na 2 izolované řetězce ssRNA, které se inkorporují do RISC komplexu (z ang. RNA-induced silencing complex) obsahující argonaut protein Ago-2. Tato inkorporace navede komplex RISC do 3'UTR (z ang. untranslated region, na 3' konci řetězce – tedy oblast, která není translatována do proteinu) cílové mRNA, což vede buďto ke sestříhu mRNA nebo inhibici exprese. Molekuly miRNA mohou také vznikat z intronů protein-kódujících genů, kdy štěpení pre-mRNA opět zajišťuje RNAáza Drosha/DGCR8. Takto exprimované miRNA, také zvané miRtrons, jsou opět transportovány do cytoplazmy a upraveny enzymem Dicer (Ho et al., 2022).

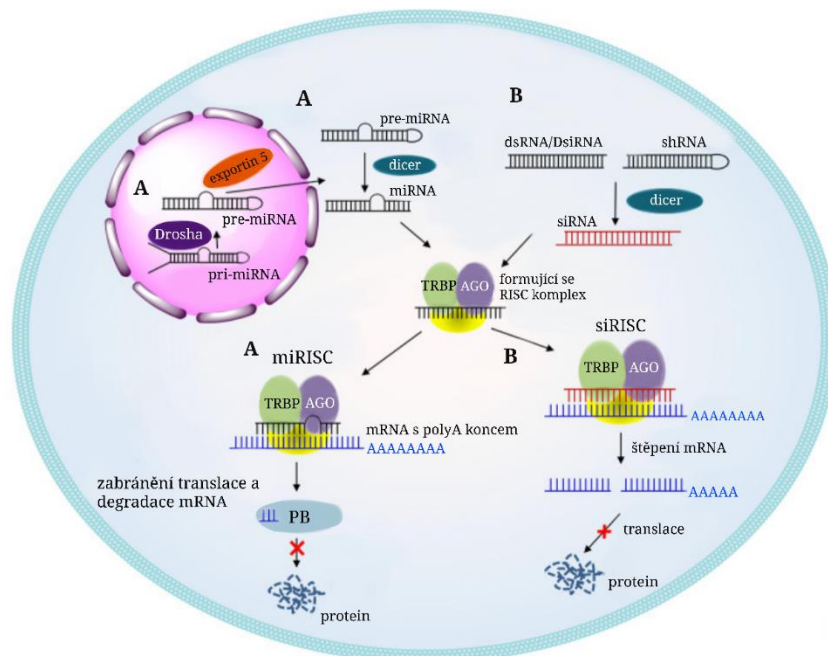
Vzniklé molekuly miRNA nepůsobí pouze v rámci jedné buňky, ve které vznikly, ale mohou být doručeny krevní cirkulací i do vzdálenějších míst. Z buňky jsou transportovány různými způsoby: zprostředkovaně pomocí exozomů (z 10 %), či ve vazbě na RNA-vazebný protein (z 90 %), kterým může být argonaut protein (Ago) nebo nukleofosmin (NPM). Transport miRNA ve vazbě na protein, či v exozomu je důležitý pro ochranu miRNA před působením všudypřítomných RNAáz (Ho et al., 2022).

4.2.2. siRNA

Molekulu siRNA odlišuje od miRNA její původ. Zatímco miRNA jsou tvořeny endogenně a jsou odvozeny z genomu jedince, siRNA může být endogenního i exogenního původu (př. z viru). Pro obě molekuly ovšem platí, že tvoří komplex s RISC, čímž ovlivňují cílovou mRNA (Wilson, Doudna, 2013).

Mechanismus siRNA má jisté podobnosti s mechanismem vzniku miRNA. Dlouhé molekuly dsRNA jsou štěpeny endoribonukleázou Dicer na kratší fragmenty siRNA. Naštěpená siRNA tvoří komplex s argonaut a dalšími proteiny za vzniku RISC komplexu. Vazbou na mRNA dochází k cílovému štěpení, které je regulováno argonaut proteiny Ago-2. Fragmenty naštěpené mRNA (o velikosti cca 12 bp) jsou následně degradovány intracelulárními exonukleázami (Raja et al., 2019).

V rámci siRNA ještě rozlišujeme mezi siRNA a DsiRNA, kdy DsiRNA je upravena endonukleázou Dicer a siRNA nikoliv. Dalším rozdílem je také délka molekuly, kdy DsiRNA nabývá délky 25-27 bp a siRNA bývá dlouhá 19-21 bp. Naštěpení Dicerem poté vede k silnější aktivitě RNAi. Na druhou stranu siRNA umožňují rozsáhlejší chemické modifikace dvouvláknového řetězce a dosahují tak vyšší stability v terapeutických přípravcích (Setten et al., 2019).



Obrázek 8; Mechanismy vzniku a působení miRNA a siRNA, kdy je cílenou degradací mRNA potlačena translace proteinu. RISC komplex je mimo příslušné nekodující RNA také tvořen argonaut proteiny (Ago) a RNA-vazebným transaktivačním proteinem (TRBP z ang. transactivation response element RNA-binding protein). Na restrikci translace se podílí také PB (z ang. P-bodies), což je označení pro cytoplazmatická tělíska obsahující vysokou koncentraci enzymů a faktorů. Upraveno dle (Hu et al., 2020).

4.2.3. VYUŽITÍ V GENOVÉ TERAPII

Terapeutika na bázi RNA lze na základě jejich působení rozdělit do dvou skupin: na RNA molekuly používané přímo jako cílová terapeutika a na léčiva cílená přímo na RNA. Molekuly RNA mají širokou škálu terapeutického využití, a to díky jejich schopnosti cílit na proteiny, transkripty i geny. Jejich nevýhodou je ovšem přítomnost RNAáz v organismu, a tedy vysoká náchylnost k degradaci. Podobně jako některá léčiva na bázi proteinů (inzulin) jsou i RNA terapeutika nevhodná pro perorální podání a musí být do organismu vpravena jiným vhodnějším způsobem, například intravenózně či subkutánně (Yu et al., 2020).

Nekódující molekuly RNA lze využívat jako biomarkery různých onemocnění, včetně nádorového bujení, kdy různě dlouhé ncRNA jsou zapojeny do různých typů rakovin. Zatímco dlouhé ncRNA jsou tkáňově specifitější, miRNA či mRNA jsou exprimovány ve více typech tkání zároveň. U RNA molekul lze také sledovat tkáňově specifické vzorce, tedy že konkrétní typy RNA se exprimují v konkrétních metastazujících tkáních. Řadí se sem například: RNA transkript související s metastázemi plicního adenokarcinomu (zkr. MALA1 z ang. metastasis associated lung adenocarcinoma transkript 1), gen kódující rakovinu prostaty (zkr. PCA3 z ang. prostate cancer gene 3) či antisense long non-coding RNA HOTAIR (Kim, Reitmair, 2013).

Například HOTAIR, jakožto lncRNA o velikosti přes 200 bp, je onkogenní molekulou, která hraje roli v různých typech rakovin, mezi které patří: rakovina prsu, žaludku či děložního čípku a kolorektální karcinom. Díky tomu je potenciálním biomarkerem pro diagnostické a terapeutické účely u různých druhů rakovin. Tato RNA se podílí na epigenetické regulaci genů a hraje důležitou roli v různých buněčných drahách díky interakci s Polycomb repressive komplexem 2 (PRK2), který je zodpovědný za metylaci histonů H3K27. Právě díky interakci s PRK2 dokáže HOTAIR, lokalizovaný v lokusu HOXC přeprogramovat stav chromatinu a podpořit tak metastazování rakoviny (Kim, Reitmair, 2013).

Spolu s onkogenními lncRNA existují i lncRNA, které ovlivňují tumor-supresorové dráhy. Příkladem je interakce s TLS proteinem⁷, který se po navázání lncRNA mění z neaktivní formy na formu aktivní. Změna konformace TLS proteinu způsobí inhibici enzymatické aktivity acetyltransferáz (př. CBP či p300) čímž dojde k umlčení genu cyklinu D1. Právě cyklin D1 je u mnoha typů nádorů mutován či nadměrně exprimován. Bylo také prokázáno, že tumor-

⁷ TLS protein (z ang. translocated in liposarcoma) je RNA/DNA vazebný protein, jehož mutací dochází k rozvoji amyotrofické laterální sklerózy. Tyto mutace jsou nejčastěji vázány na C konec peptidového řetězce, čímž dojde k narušení transportu TLS do jádra buňky a rozvoji ALS (Yoneda et al., 2016).

supresorový gen p53 indukuje tvorbu lncRNA jako odpověď na poškození DNA a že lncRNA mohou interagovat transkripčními faktory (Kim, Reitmair, 2013).

Konkrétním případem zacílení na nádorové bujení je inhibice onkogenní mRNA technologiemi RNAi, které umožňují potlačit růst nádoru. Jedná se například o transfekci ABL/BCR pomocí siRNA do buněčné linie chronické myeloidní leukémie, čímž dochází k inhibici exprese ABL/BCR mRNA a zároveň dochází ke snížení úrovně malignity buněk a k indukci apoptózy. Molekuly RNAi mohou také zvyšovat účinnost chemoterapie právě díky navození apoptózy i u jiných leukemických buněčných linií (př. HL-60), čímž dojde ke zvýšení citlivosti na léky používané v chemoterapii (např. etoposid a daunorubicin). RNAi lze využít také u multirezistentních nádorů, které odolávají chemoterapiím. Jedná se například o MDR1 – gen multirezistence, který hraje důležitou roli v rezistenci nádorů vůči chemoterapii a který lze významně inhibovat transfekcí siRNA do buněčných linií karcinomu pankreatu a žaludku (Xin et al., 2017).

Mezi další a relativně nedávno schválená léčiva patří Patisiran (ONPATPRO®) a Givosiran (GIVLAARI®). Terapeutikum Patisiran obsahuje dvouřetězcovou siRNA, která dokáže inhibovat syntézu transthyretinu (TTR) a slouží k léčbě dědičné transthyretinové amyloidózy. Toto onemocnění je způsobeno tvorbou amyloidů chybně složeného TTR, které se ukládají ve tkáních (srdeční svalovina, periferní nervy), což vede k jejich poškození. Lék je formován do lipidových nanočástic (liposomů), pro cílené doručení do hepatocytů – primárního místa syntézy TTR a je podáván intravenózně. Po vstupu do jater se siRNA váže na 3' UTR mRNA TTR a degraduje ji, čímž inhibuje syntézu TTR. V rámci klinických studií byl lék Patisiran označen za bezpečný, účinný a nevykazoval závažné vedlejší účinky. U pacientů byl detekovatelný snížený vitamín A v séru, což lze substituovat současnou transfuzí vitamínu A (Urits et al., 2020).

Givosiran je terapeutikem pro léčbu jaterních porfyrií – metabolických poruch spojených s defektem enzymů účastnících se biosyntézy hemu (Santos, Rato, 2021). Jedná se opět o siRNA, která je cílená na aminolevulát syntázu 1 (ALAS1) syntetizovanou v játrech. Doručení siRNA dojde k regulaci mRNA ALAS1, čímž dojde k zabránění akumulace neurotoxické kyseliny δ -aminolevulové a zvýšeným hladinám porfobilinogenu (Scott, 2020).

ZÁVĚR

Cílem práce bylo popsat principy jednotlivých odvětví genové terapie – od způsobu úpravy genů, přes jeho doručení transportním vektorem až ke konkrétním příkladům genových terapeutik a jejich použití. V této práci jsou popsány transportní vektory – virové i nevirové, jejich výčet a obecné vlastnosti. Mimo úpravy genů *in vivo*, mezi které patří nukleázy TALE, ZF a systém CRISPR jsou dále popsány RNAi, které spolu s methylací DNA spadají do epigenetických úprav. V rámci každé kapitoly je zmíněno také využití dané metody v genové terapii. Bakalářská práce přináší stručný přehled technik genové terapie a jejich využití pro léčbu, který může být pomůckou každému, kdo se o danou problematiku zajímá.

V posledních letech dochází na poli genové terapie k neustálým pokrokům. Zlepšení se týkají nejen způsobů doručení, zacílení a bezpečnosti vektorů genové terapie, ale také jednotlivých metod úpravy genů. Účinnosti transfekce jsou zkoumány na zvířecích modelech a také v klinických studiích. Využití genové terapie je v současnosti spojeno s vyvíjením léčiv pro nevyléčitelná onemocnění. Jednou z popsaných je technologie CART (respektive univerzální UCART19), kdy jsou geny autologních T-lymfocytů upraveny nukleázami TALE a transdukovány lentivirovými vektory. Tato imunoterapie nabízí slibné výsledky u pacientů s relapsy B-lymfocytárních malignit.

Mezi metody genové terapie patří mimo úpravu cílových genů také gene silencing (umlčování genů), které zprostředkovávají RNA interference. Mezi RNAi se řadí různé druhy RNA molekul, jako například siRNA či miRNA, které ve vazbě na RISC komplex degradují cílovou mRNA a znemožňují translaci cílového proteinu. Jako příklad lze uvést inhibice exprese genu MDR1, který je nositelem multirezistence u nádorů a znesnadňuje tak chemoterapii a celkovou léčbu. V současné době jsou již FDA schválená léčiva, jako například Patisiran a Givosiran. Patisiran je využíván k léčbě dědičné transthyretinové amyloidózy a Givosiran k léčbě jaterních porfyrií. Obě terapeutika jsou založena na siRNA, která interaguje s defektní mRNA způsobující patologii. Řadu nekódujících molekul RNA lze využít také jako biomarkery pro diagnostiku rozvoje malignit.

Mezi schválená léčiva patří i terapeutika, které cílí na methyltransferázy, a tedy řídí metylaci DNA. Řada těchto léčiv je zacílena na inhibici methyltransferáz a léčbu různých druhů karcinomů či autoimunitních onemocnění (revmatoidní artritida, systémová sklerodermie). Některá z těchto léčiv jsou bohužel spojena s nežádoucími účinky, jako například Azacitidin,

který je chválen k léčbě myelodysplastického syndromu a revmatoidní artritidy, je spojen s gastrointestinální toxicitou a cytopenií.

Genová terapie je novodobé odvětví, které zažívá nebývalý rozmach v posledních letech. V současné době se již řada preparátů a technik přesunula z vědeckých laboratoří do klinické praxe, což potvrzuje množství schválených terapeutik. Zájem o toto odvětví rovněž potvrzuje množství klinických studií, které se snaží na trh uvést nové preparáty. Většina genové terapie se soustředí na použití menších molekul, ať již malých nekódujících RNA nebo DNA vektorů. V menší míře se provádí úprava buněk *ex-vivo*, jako je tomu např. u technologie CAR. Zatím jsou snad pouze teoreticky diskutovány skutečné úpravy genomu somatických buněk pacientů, neboť tato technika zatím přináší příliš mnoho rizik, ale s postupným poznáním nových technik, jako je CRISPR a získáním zkušeností s jednodušší genovou terapií, se jistě i tyto techniky začnou více prosazovat.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- AIUTI, Alessandro et al. 2017. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. *EMBO Molecular Medicine* [online]. **9**(6), 737-740. [cit. 2022-08-01]. ISSN 1757-4676. Dostupné z: <https://doi.org/10.15252/emmm.201707573>
- ALBERTS, Bruce. 1998. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero. ISBN 80-902906-2-0.
- ANSON, Donald S. 2004. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks?: A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genetic Vaccines and Therapy* [online]. **2**(1). [cit. 2023-08-05]. ISSN 14790556. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1479-0556-2-9>
- ASGHAR, Adam Ali et al. 2022. Zynteglo: Betibeglogene autotemcel – An innovative therapy for β -thalassemia patients. *Annals of Medicine & Surgery* [online]. **82**. [cit. 2023-02-16]. ISSN 2049-0801. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104624>
- BARRANGOU, Rodolphe et al. 2007. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* [online]. **315**(5819), 1709-1712. [cit. 2023-02-16]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- BECKER, Sebastian; BOCH, Jens. 2021. TALE and TALEN genome editing technologies. *Gene and Genome Editing* [online]. **2**. [cit. 2023-02-18]. ISSN 26663880. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ggedit.2021.100007>
- BEDNÁŘ, Marek; ET AL., . 1996. *Lékařská mikrobiologie*. 1. Praha: Triton, 560 s. ISBN 8594031505280.
- BENJAMIN, Ronald et al. 2016. TALEN gene editing takes aim on HIV. *Human Genetics* [online]. **135**(9), 1059-1070. [cit. 2023-02-04]. ISSN 0340-6717. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1678-2>
- BLAESE, R. Michael; CULVER, Kenneth W. 1995. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA – SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science* [online]. **270**(5235), 475-480. [cit. 2022-10-29]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475>
- CAPECCHI, Mario R. 2005. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Reviews Genetics* [online]. **6**(6), 507-512. [cit. 2022-12-02]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrg1619>
- CARROLL, D. 2008. Progress and prospects: Zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Therapy* [online]. **15**(22), 1463-1468. [cit. 2023-03-02]. ISSN 0969-7128. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/gt.2008.145>
- CLARK, David; PAZDERNIK, Nanette. 2012. *Biotechnology*. Update edition. London: Burlington, Mass; Elsevier, AP Cell Press. ISBN 978-0-12-385063-8.

- DASTGHAIB, Sanaz et al. 2021. Role of apoptosis, autophagy, and the unfolded protein response in glioblastoma chemoresistance. In: *Glioblastoma Resistance to Chemotherapy: Molecular Mechanisms and Innovative Reversal Strategies* [online]. Elsevier, s. 201-242. [cit. 2023-04-14]. ISBN 9780128215678. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821567-8.00016-6>
- FLOTTE, TR; CARTER, BJ. 1995. Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Therapy*. **2**(6), 357-362.
- FRIEDMANN, Theodore. 1992. A brief history of gene therapy. *Nature Genetics* [online]. **2**(2), 93-98. [cit. 2022-08-01]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ng1092-93>
- GADENSTAETTER, ANSELM J. et al. 2022. Intranasal application of adeno-associated viruses: a systematic review. *Translational Research* [online]. **248**, 87-110. [cit. 2022-10-30]. ISSN 19315244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2022.05.002>
- GAJ, Thomas et al. 2016. Genome-Editing Technologies: Principles and Applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **8**(12). [cit. 2022-09-07]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023754>
- GAO, Haishan et al. 2012. Crystal structure of a TALE protein reveals an extended N-terminal DNA binding region. *Cell Research* [online]. **22**(12), 1716-1720. [cit. 2023-02-19]. ISSN 1001-0602. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/cr.2012.156>
- GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel; PAIVA, Raquel de Melo Alves. 2017. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (São Paulo)* [online]. **15**(3), 369-375. [cit. 2023-08-01]. ISSN 1679-4508. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/s1679-45082017rb4024>
- GOODSELL, D.S. 2010. Adenovirus. *RCSB Protein Data Bank* [online]. [cit. 2023-03-30]. ISSN 1234-432X. Dostupné z: https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2010_12
- GRIFFITHS, Elizabeth A.; GORE, Steven D. 2013. Epigenetic Therapies in MDS and AML. In: KARPFF, Adam R. (ed.). *Epigenetic Alterations in Oncogenesis* [online]. New York, NY: Springer New York, s. 253-283. [cit. 2023-04-14]. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-1-4419-9966-5. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9967-2_13
- GUO, Xia; HUANG, Leaf. 2012. Recent Advances in Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Accounts of Chemical Research* [online]. **45**(7), 971-979. [cit. 2022-10-06]. ISSN 0001-4842. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ar200151m>
- HAINÉ, Aung Thu; NIIDOME, Takuro. 2017. Gold Nanorods as Nanodevices for Bioimaging, Photothermal Therapeutics, and Drug Delivery. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* [online]. **65**(7), 625-628. [cit. 2022-10-29]. ISSN 0009-2363. Dostupné z: <https://doi.org/10.1248/cpb.c17-00102>
- HAMILTON, James P. 2011. Epigenetics: Principles and Practice. *Digestive Diseases* [online]. **29**(2), 130-135. [cit. 2023-04-11]. ISSN 0257-2753. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000323874>

- HARMATZ, Paul et al. 2022. First-in-human in vivo genome editing via AAV-zinc-finger nucleases for mucopolysaccharidosis I/II and hemophilia B. *Molecular Therapy* [online]. **30**(12), 3587-3600. [cit. 2023-03-2]. ISSN 15250016. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.10.010>
- HILL, Sophie F.; MEISLER, Miriam H. 2021. Antisense Oligonucleotide Therapy for Neurodevelopmental Disorders. *Developmental Neuroscience* [online]. **43**(3-4), 247-252. [cit. 2023-04-06]. ISSN 0378-5866. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000517686>
- HO, Phuong T. B. et al. 2022. MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **23**(13). [cit. 2023-04-08]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23137167>
- HUANG, Kun; ZAPATA, Daniel. 2022. In vivo delivery of CRISPR-Cas9 genome editing components for therapeutic applications. *Biomaterials* [online]. **291**. [cit. 2023-02-16]. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121876>
- HU, Bo et al. 2020. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. **5**(1). [cit. 2023-04-06]. ISSN 2059-3635. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>
- CHRISTIAN, Michelle et al. 2010. Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* [online]. **186**(2), 757-761. [cit. 2023-03-02]. ISSN 1943-2631. Dostupné z: <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>
- IM, Wooseok; MOON, Jangsup. 2016. Applications of CRISPR/Cas9 for Gene Editing in Hereditary Movement Disorders. *Journal of Movement Disorders* [online]. **9**(3), 136-143. [cit. 2022-12-04]. ISSN 2005-940X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14802/jmd.16029>
- ISALAN, M. 2013. Zinc Fingers. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry* [online]. Elsevier, s. 575-579. [cit. 2023-03-02]. ISBN 9780123786319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00027-X>
- ISALAN, Mark. 2012. Zinc-finger nucleases: how to play two good hands. *Nature Methods* [online]. **9**(1), 32-34. [cit. 2023-02-20]. ISSN 1548-7091. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1805>
- ISHINO, Yoshizumi; KRUPOVIC, Mart. 2018. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of Bacteriology* [online]. **200**(7). [cit. 2023-02-16]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JB.00580-17>
- JEN, Jayu; WANG, Yi-Ching. 2016. Zinc finger proteins in cancer progression. *Journal of Biomedical Science* [online]. **23**(1). [cit. 2023-03-02]. ISSN 1423-0127. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0269-9>
- JINEK, Martin et al. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* [online]. **337**(6096), 816-821. [cit. 2023-02-16]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

- KAMIMURA, Kenya et al. 2012. Advances in Gene Delivery Systems. *Pharmaceut Med.* **25**(5), 293–306. [cit. 2023-10-19] Dostupné z: <https://doi.org/10.2165/11594020-000000000-00000>
- KANG, Eugene L. et al. 2012. BACE1 Protein Endocytosis and Trafficking Are Differentially Regulated by Ubiquitination at Lysine 501 and the Di-leucine Motif in the Carboxyl Terminus. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **287**(51), 42867-42880. [cit. 2023-02-17]. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407072>
- KANG, Jonghoon et al. 2019. Epigenetics for the 21st-Century Biology Student. *Journal of Microbiology & Biology Education* [online]. **20**(3). [cit. 2022-08-01]. ISSN 1935-7877. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/jmbe.v20i3.1687>
- KAY, Sabine et al. 2007. A Bacterial Effector Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Cell Size Regulator. *Science* [online]. **318**(5850), 648-651. [cit. 2023-02-18]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1144956>
- KIM, Taiho; REITMAIR, Armin. 2013. Non-Coding RNAs: Functional Aspects and Diagnostic Utility in Oncology. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **14**(3), 4934-4968. [cit. 2023-04-08]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms14034934>
- KLUG, Aaron. 2010. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Quarterly Reviews of Biophysics* [online]. **43**(1), 1-21. [cit. 2022-12-02]. ISSN 0033-5835. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0033583510000089>
- KNOPMAN, David S. et al. 2021. Alzheimer disease. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. **7**(1). [cit. 2023-02-17]. ISSN 2056-676X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>
- KORDASIEWICZ, Holly B. et al. 2012. Sustained Therapeutic Reversal of Huntington's Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis. *Neuron* [online]. **74**(6), 1031-1044. [cit. 2023-02-16]. ISSN 08966273. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.009>
- KUMAR, Priti et al. 2019. Electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. **2019**(7). [cit. 2022-10-29]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/pdb.top096271>
- LEE, Seung Hwan; BAE, Sangsu. 2016. Structural and dynamic views of the CRISPR-Cas system at the single-molecule level. *BMB Reports* [online]. **49**(4), 201-207. [cit. 2023-02-16]. ISSN 1976-6696. Dostupné z: <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.4.042>
- LÜBBERT, Michael et al. 2016. Decitabine improves progression-free survival in older high-risk MDS patients with multiple autosomal monosomies: results of a subgroup analysis of the randomized phase III study 06011 of the EORTC Leukemia Cooperative Group and German MDS Study Group. *Annals of Hematology* [online]. **95**(2), 191-199. [cit. 2023-04-14]. ISSN 0939-5555. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2547-0>
- LUNDSTROM, Kenneth. 2018. Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases* [online]. **6**(2). [cit. 2022-10-29]. ISSN 2079-9721. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/diseases6020042>

- MAKAROVA, Kira S.; KOONIN, Eugene V. 2015. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. In: *CRISPR* [online]. New York, NY: Springer New York, s. 47-75. [cit. 2023-02-16]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-2686-2. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9_4
- MARTISOVA, Andrea; HOLCAKOVA, Jitka; IZADI, Nasim. 2021. DNA Methylation in Solid Tumors: Functions and Methods of Detection. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(8). [cit. 2023-04-11]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22084247>
- MCMAHON, Moira A; RAHDAR, Meghdad. 2012. Gene editing: not just for translation anymore. *Nature Methods* [online]. **9**(1), 28-31. [cit. 2022-12-04]. ISSN 1548-7091. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1811>
- MITTELSTAEDT, Nathalia Noschang; BECKER, André Luiz; DE FREITAS, Deise Nascimento. 2021. DNA Methylation and Immune Memory Response. *Cells* [online]. **10**(11). [cit. 2023-04-11]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells10112943>
- NEUHAUS, David. 2022. Zinc finger structure determination by NMR: Why zinc fingers can be a handful. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* [online]. **130-131**, 62-105. [cit. 2023-03-02]. ISSN 00796565. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2022.07.001>
- PARK, Hanseul et al. 2019. In vivo neuronal gene editing via CRISPR–Cas9 amphiphilic nanocomplexes alleviates deficits in mouse models of Alzheimer’s disease. *Nature Neuroscience* [online]. **22**(4), 524-528. [cit. 2023-02-17]. ISSN 1097-6256. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0352-0>
- PÉREZ-MARTÍNEZ, Francisco C. et al. 2012. The Use of Nanoparticles for Gene Therapy in the Nervous System. *Journal of Alzheimer's Disease* [online]. **31**(4), 697-710. [cit. 2022-10-06]. ISSN 18758908. Dostupné z: <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120661>
- PINHEIRO, Pedro; A. GAMMAGE, Payam; MINCZUK, Michal. 2020. Mitochondrially targeted zinc finger nucleases. In: *The Human Mitochondrial Genome* [online]. Elsevier, s. 499-514. [cit. 2023-03-02]. ISBN 9780128196564. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819656-4.00019-X>
- QASIM, Waseem et al. 2017. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Science Translational Medicine* [online]. **9**(374). [cit. 2023-02-19]. ISSN 1946-6234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaj2013>
- RAJA, Maria Abdul Ghafoor et al. 2019. Design, mechanism, delivery and therapeutics of canonical and Dicer-substrate siRNA. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **14**(5), 497-510. [cit. 2023-04-08]. ISSN 18180876. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.12.005>
- RAMAMOORTHY, Murali. 2015. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH* [online]. [cit. 2022-10-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10443.5394>

- RICH, Joseph et al. 2022. Sonoporation: Past, Present, and Future. *Advanced Materials Technologies* [online]. **7**(1). [cit. 2022-10-29]. ISSN 2365-709X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/admt.202100885>
- RODRIGUEZ, Alicia et al. 2013. Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy. In: MARTIN, Francisco (ed.). *Gene Therapy - Tools and Potential Applications* [online]. InTech. [cit. 2022-10-06]. ISBN 978-953-51-1014-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/52704>
- RYU, Wang-Shick. 2017. Herpesviruses. In: *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses* [online]. Elsevier, s. 125-139. [cit. 2023-08-05]. ISBN 9780128008386. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800838-6.00009-6>
- SALES, Amanda J.; GUIMARÃES, Francisco S.; JOCA, Sâmia R.L. 2021. DNA methylation in stress and depression: from biomarker to therapeutics. *Acta Neuropsychiatrica* [online]. **33**(5), 217-241. [cit. 2023-04-11]. ISSN 0924-2708. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/neu.2021.18>
- SAMUEL, Charles E. 2021. Enzymes | Adenosine Deaminases. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry III* [online]. 3. Elsevier, s. 362-367. [cit. 2022-10-29]. ISBN 9780128220405. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21352-6>
- SANDER, Jeffrey D; JOUNG, J Keith. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology* [online]. **32**(4), 347-355. [cit. 2022-12-05]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nbt.2842>
- SANTOS, Miguel; RATO, Miguel. 2021. Neurology of the acute hepatic porphyrias. *Journal of the Neurological Sciences* [online]. **428**. [cit. 2023-04-09]. ISSN 0022510X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2021.117605>
- SCOTT, Lesley J. 2020. Givosiran: First Approval. *Drugs* [online]. **80**(3), 335-339. [cit. 2023-04-09]. ISSN 0012-6667. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01269-0>
- SETTEN, Ryan L. et al. 2019. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. **18**(6), 421-446. [cit. 2023-04-08]. ISSN 1474-1776. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>
- SCHOLZ, Jonas et al. 2022. An Adenoviral Vector as a Versatile Tool for Delivery and Expression of miRNAs. *Viruses* [online]. **14**(9). [cit. 2022-10-29]. ISSN 1999-4915. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/v14091952>
- SINGH, Vijai. 2020. An introduction to genome editing CRISPR-Cas systems. In: *Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System* [online]. Elsevier, s. 1-13. [cit. 2023-02-16]. ISBN 9780128181409. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818140-9.00001-5>
- SKUKAN, Laura et al. 2022. Lentivirus- or AAV-mediated gene therapy interventions in ischemic stroke: A systematic review of preclinical in vivo studies. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* [online]. **42**(2), 219-236. [cit. 2022-12-03]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0271678X211039997>
- SUN, Ning et al. 2018. DNMTs inhibitor SGI-1027 induces apoptosis in Huh7 human hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Letters* [online]. [cit. 2023-04-14]. ISSN 1792-1074. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9390>

- URITS, Ivan et al. 2020. A Review of Patisiran (ONPATPRO®) for the Treatment of Polyneuropathy in People with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Neurology and Therapy* [online]. **9**(2), 301-315. [cit. 2023-04-09]. ISSN 2193-8253. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40120-020-00208-1>
- VASQUEZ, Karen M. et al. 2001. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **98**(15), 8403-8410. [cit. 2021-12-02]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.111009698>
- WALTERS, Mark C. et al. 2022. Lovo-cel (bb1111) Gene Therapy for Sickle Cell Disease: Updated Clinical Results and Investigations into Two Cases of Anemia from Group C of the Phase 1/2 HGB-206 Study. *Blood* [online]. **140**(1), 26-28. [cit. 2022-10-29]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/blood-2022-162288>
- WANG, Sumei; WU, Wanyin. 2018. DNA Methylation Alterations in Human Cancers. In: *Epigenetics in Human Disease* [online]. Elsevier, s. 109-139. [cit. 2023-04-11]. ISBN 9780128122150. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812215-0.00005-4>
- WARNOCK, James N. et al. 2011. Introduction to Viral Vectors. In: MERTEN, Otto-Wilhelm; AL-RUBEAI, Mohamed (ed.). *Viral Vectors for Gene Therapy* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, s. 1-25. [cit. 2022-10-29]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61779-094-2. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-095-9_1
- WILSON, Ross C.; DOUDNA, Jennifer A. 2013. Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annual Review of Biophysics* [online]. **42**(1), 217-239. [cit. 2023-04-08]. ISSN 1936-122X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>
- WIRTH, Thomas; PARKER, Nigel. 2013. History of gene therapy. *Gene* [online]. **525**(2), 162-169. [cit. 2022-08-01]. ISSN 03781119. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>
- WU, Xuebing; KRIZ, Andrea J. 2014. Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quantitative Biology* [online]. **2**(2), 59-70. [cit. 2022-12-04]. ISSN 2095-4689. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40484-014-0030-x>
- XIN, Yong et al. 2017. Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy. *Molecular Cancer* [online]. **16**(1). [cit. 2023-04-09]. ISSN 1476-4598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0683-y>
- XU, Zheng-yin et al. 2017. Action modes of transcription activator-like effectors (TALEs) of Xanthomonas in plants. *Journal of Integrative Agriculture* [online]. **16**(12), 2736-2745. [cit. 2023-02-18]. ISSN 20953119. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61750-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61750-7)
- YONEDA, Ryoma et al. 2016. The binding specificity of Translocated in LipoSarcoma/FUsed in Sarcoma with lncRNA transcribed from the promoter region of cyclin D1. *Cell & Bioscience* [online]. **6**(1). [cit. 2023-04-09]. ISSN 2045-3701. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13578-016-0068-8>
- YOSHIMI, Kazuto; MASHIMO, Tomoji. 2022. Genome editing technology and applications with the type I CRISPR system. *Gene and Genome Editing* [online]. **3-4**. [cit. 2022-12-04]. ISSN 26663880. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ggedit.2022.100013>

YU, Ai-Ming et al. 2020. RNA Drugs and RNA Targets for Small Molecules: Principles, Progress, and Challenges. *Pharmacological Reviews* [online]. **72**(4), 862-898. [cit. 2023-04-08]. ISSN 0031-6997. Dostupné z: <https://doi.org/10.1124/pr.120.019554>

ZHANG, Lian; LU, Qianjin; CHANG, Christopher. 2020. Epigenetics in Health and Disease. In: CHANG, Christopher; LU, Qianjin (ed.). *Epigenetics in Allergy and Autoimmunity* [online]. Singapore: Springer Singapore, s. 3-55. [cit. 2023-04-11]. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-981-15-3448-5. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-981-15-3449-2_1

ZHANG, Xiaomei et al. 2022. Gene knockout in cellular immunotherapy: Application and limitations. *Cancer Letters* [online]. **540**. [cit. 2023-02-16]. ISSN 03043835. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215736>

ZHANG, Yuan et al. 2012. In Vivo Gene Delivery by Nonviral Vectors: Overcoming Hurdles?. *Molecular Therapy* [online]. **20**(7), 1298-1304. [cit. 2022-10-06]. ISSN 15250016. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/mt.2012.79>

ZHAO, Like et al. 2017. Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes identifies TRAF1, CTGF, and CX3CL1 genes as hypomethylated in osteoarthritis. *Clinical Rheumatology* [online]. **36**(10), 2335-2342. [cit. 2023-04-11]. ISSN 0770-3198. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3667-9>

ZITVOGEL, Laurence; KROEMER, Guido. 2014. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *OncoImmunology* [online]. **1**(8), 1223-1225. [cit. 2023-02-16]. ISSN 2162-402X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/onci.21335>