

Neželjene promjene genoma kao posljedica uvođenja ciljanih genetičkih modifikacija

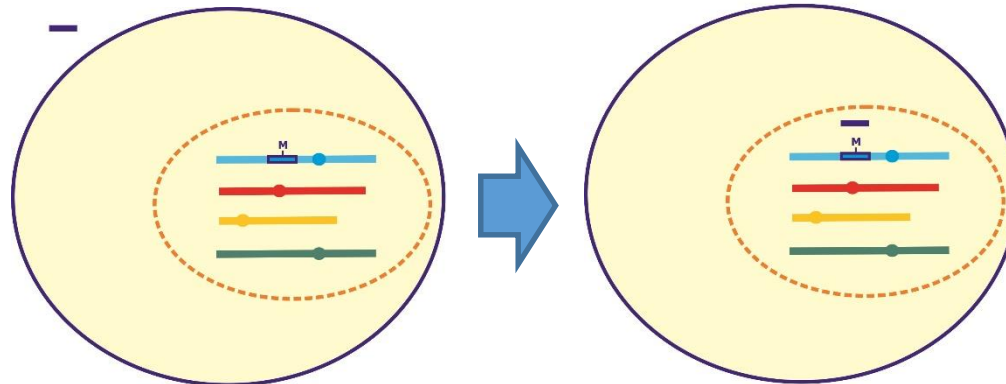
doc. dr. sc. Anamarija Štafa

**Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama
Zavod za biokemijsko inženjerstvo**

GENSKA TERAPIJA

HUMANE MONOGENSKE BOLESTI (WHO):

- rezultat mutacije u jednom genu
 - više od 10 000 monogenских bolesti
 - priroda bolesti ovisi o tome koju funkciju ima produkt mutiranog gena
-
- idealno liječenje: genska terapija (DNA se često unosi pomoću virusnih vektora)



SCID - Severe Combined ImmunoDefficiency

Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease

Marina Cavazzana-Calvo,^{*1,2,3} Salima Hacein-Bey,^{*1,2,3}
Geneviève de Saint Basile,¹ Fabian Gross,² Eric Yvon,³
Patrick Nusbaum,² Françoise Selz,¹ Christophe Hue,^{1,2}
Stéphanie Certain,¹ Jean-Laurent Casanova,^{1,4} Philippe Bousso,⁵
Françoise Le Deist,¹ Alain Fischer^{1,2,4†}

Severe combined immunodeficiency-X1 (SCID-X1) is an X-linked inherited disorder characterized by an early block in T and natural killer (NK) lymphocyte differentiation. This block is caused by mutations of the gene encoding the γ c cytokine receptor subunit of interleukin-2, -4, -7, -9, and -15 receptors, which participates in the delivery of growth, survival, and differentiation signals to early lymphoid progenitors. After preclinical studies, a gene therapy trial for SCID-X1 was initiated, based on the use of complementary DNA containing a defective γ c Moloney retrovirus-derived vector and ex vivo infection of CD34⁺ cells. After a 10-month follow-up period, γ c transgene-expressing T and NK cells were detected in two patients. T, B, and NK cell counts and function, including antigen-specific responses, were comparable to those of age-matched controls. Thus, gene therapy was able to provide full correction of disease phenotype and, hence, clinical benefit.

Science (2000) **288**: 669-672

A tragic setback

With one French gene-therapy patient having developed a form of cancer, a frantic detective effort is under way to determine what went wrong — and to assess the risks faced by others. Erika Check reports.

Nature (2002) **420**: 116-119

LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1

Science (2003) **302**: 415-419

- do 2008:

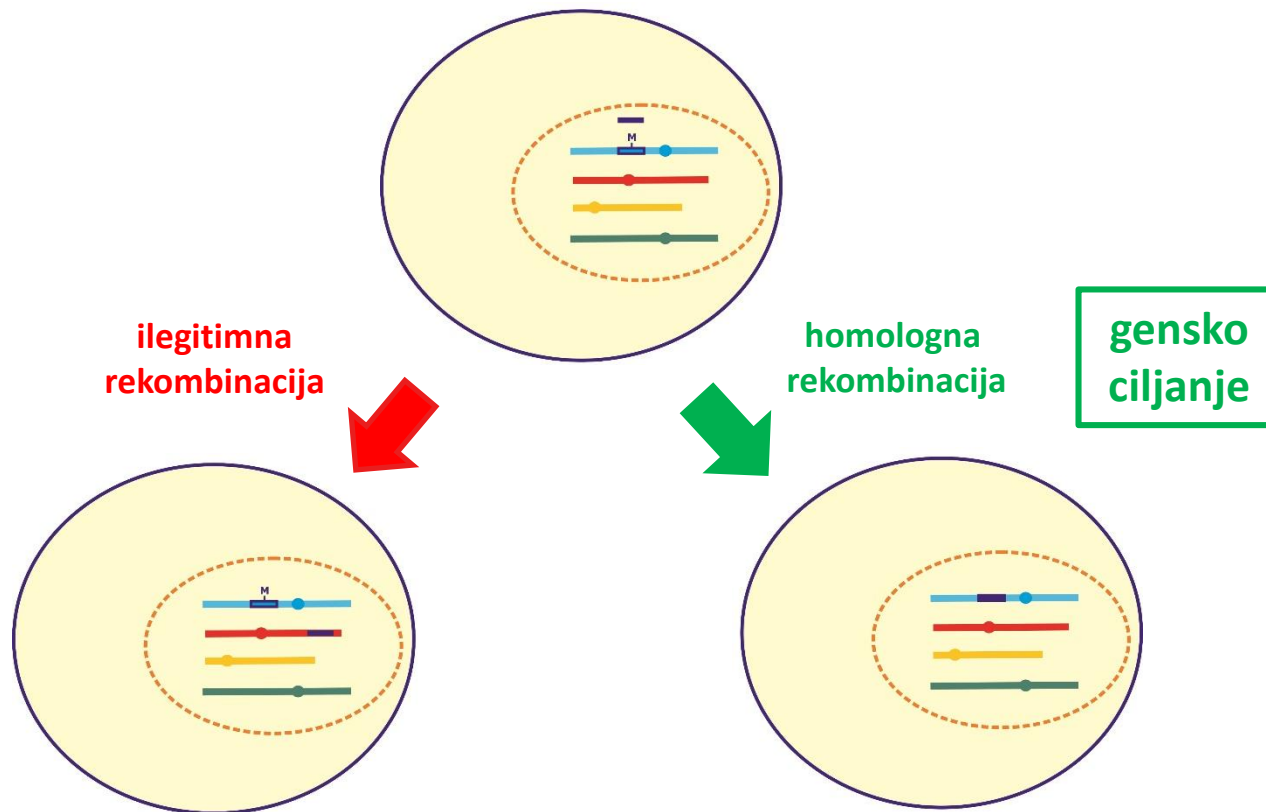
- liječeno / izliječeno – 10 / 9 djece

**ali 4 djece se razbolilo od leukemije
3-6 godina nakon tretmana!!!!**

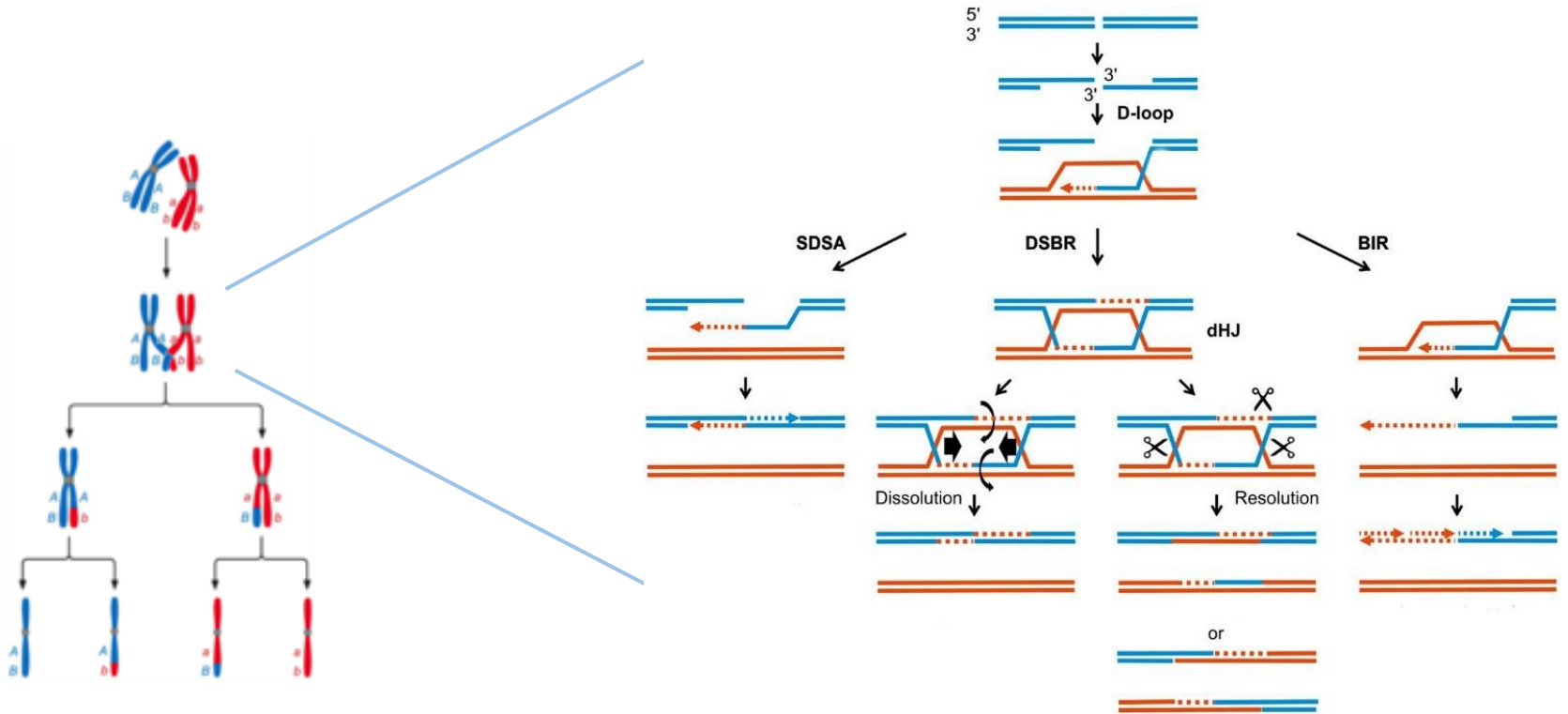
GENSKA TERAPIJA i GENSKO CILJANJE

Insertional mutagenesis combined
with acquired somatic mutations causes
leukemogenesis following gene therapy
of SCID-X1 patients

JCI (2008) **118**: 3143-3150



HOMOLOGNA REKOMBINACIJA I POPRAVAK DNA



- parametri koji utječu na uspješnost:

1. popravka dvolančanih lomova u DNA
2. genskog ciljanja

MODELNI ORGANIZAM ZA ISTRAŽIVANJE POPRAVKA DNA

Kultura humanih stanica:

- odabir tipa stanica
- istraživanja dugo traju (gen. vrijeme >20 h)
- skupo

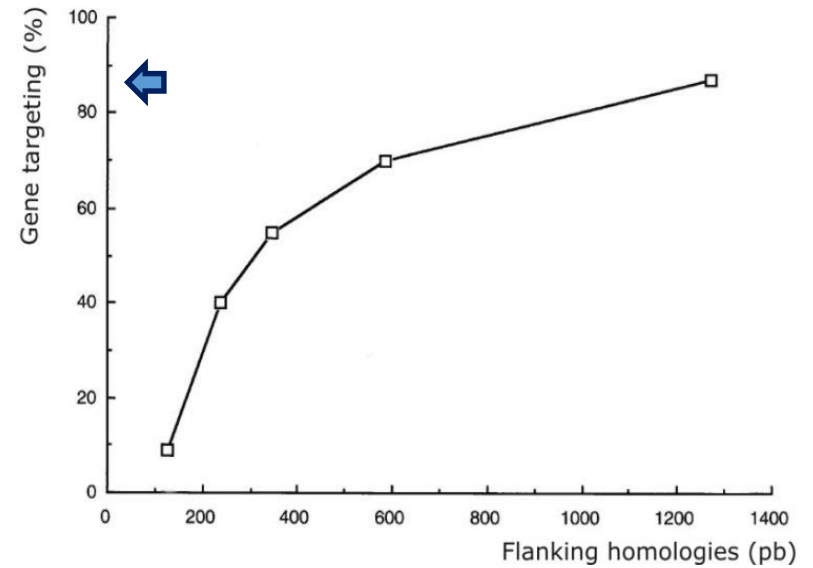
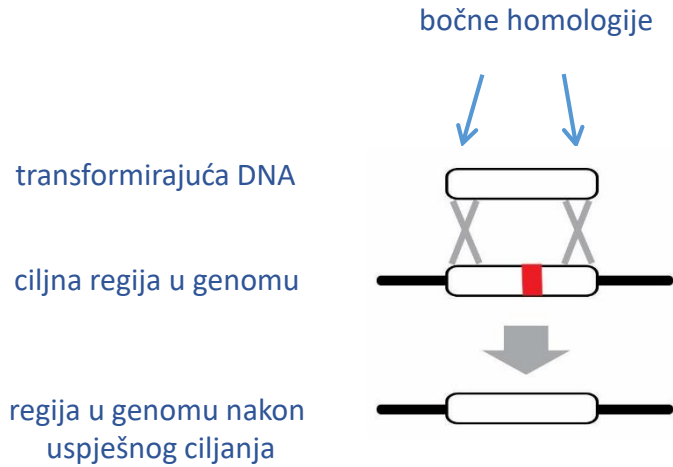


Modelni organizmi – brži i jeftiniji eksperimenti

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*:

- prvi eukariotski organizam čiji je genom sekvenciran (Goffeau et al., 1996)
- najvažniji eukariotski modelni organizam (proteini i mehanizmi su evolucijski sačuvani)
- koristi se u istraživanjima svih procesa u eukariotskoj stanici:
 - mitotička i mejotička rekombinacija
 - prijenos signala unutar stanice
 - međustanična komunikacija
 - polarizacija i diferencijacija stanice
 - asimetrično nasljeđivanje
 - apoptoza, starenje, dugovječnost i smrt...

MODIFIKACIJA GENA U JEDNOM KORAKU

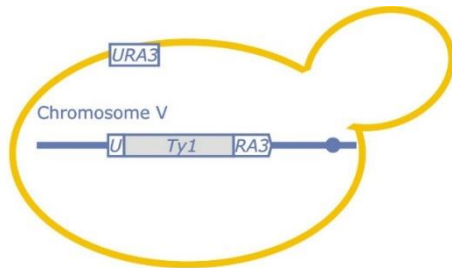


kvasac *S. cerevisiae*
(Bailis and Maines, 1996)

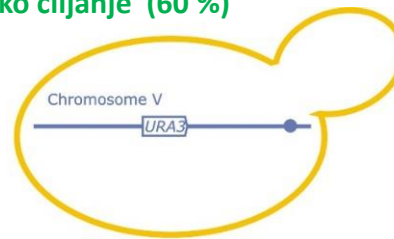
REKOMBINACIJA "KRAJEVI-VAN"

Uspješnost genskog ciljanja ovisi o
dužini bočnih homologija

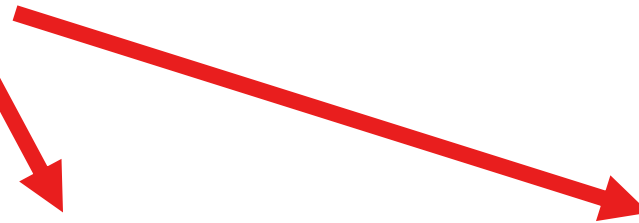
GENSKO CILJANJE – SPEKTAR DOGAĐAJA



Gensko ciljanje (60 %)



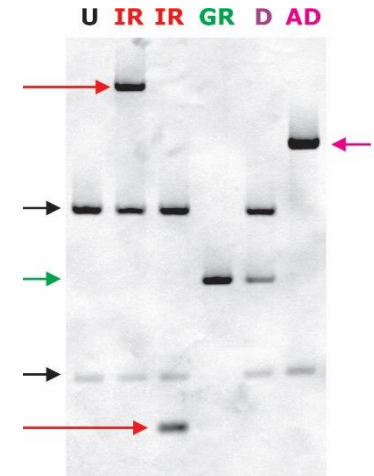
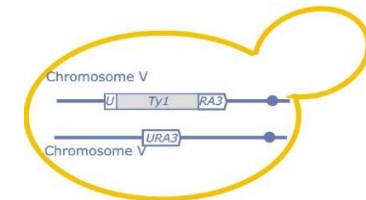
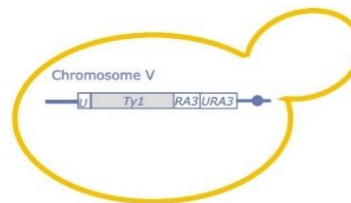
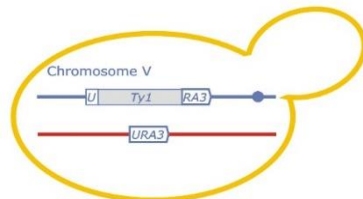
+



Nasumična integracija
transf. fragmenta (8,9 %)
ILEGITIMNA REKOMBINACIJA

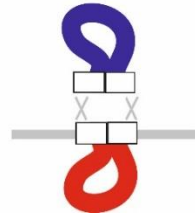
Integracija transformirajućeg fragmenta
tik do homologije (10 %)
ADICIJA

Prisustvo netransformiranog alela i alela koji se
očekuje nakon genskog ciljanja (21,1 %)
DUPLIKACIJA CILJNOG KROMOSOMA

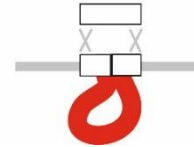




INSERCIJA



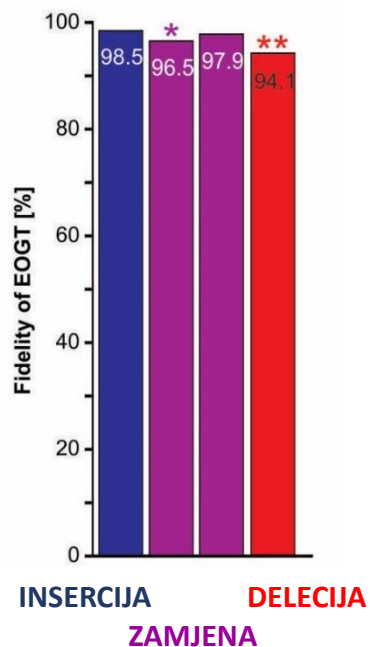
ZAMJENA



DELECIJA

1. Postotak genskog ciljanja?
2. Spektar aberantnih događaja?
3. Mehanizam kojim nastaju duplikacije ciljnog kromosoma?
4. Utjecaj metode za unos DNA?

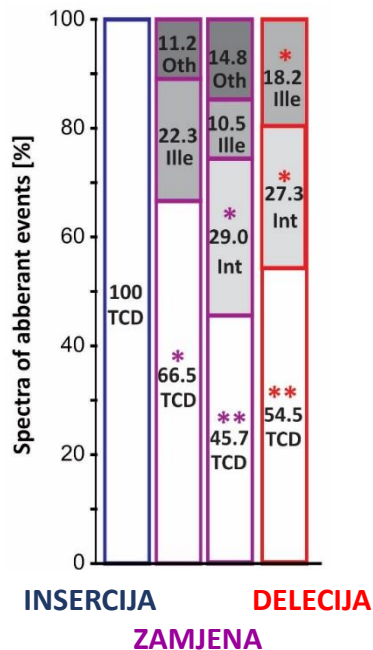
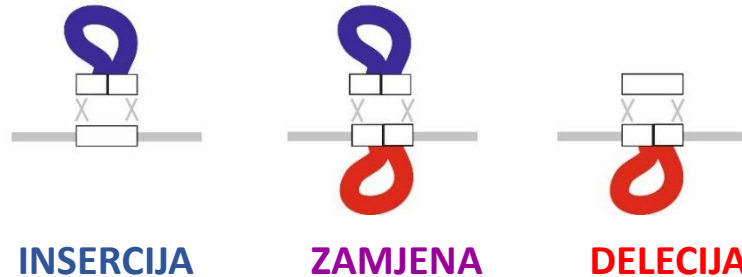
1. UTJEČE LI TIP MODIFIKACIJE GENA NA POSTOTAK CILJANJA?



Gensko ciljanje je uspješnije ako se transformirajuća DNA insertira u genom!

→ isto vrijedi za humane stanice (Russel et al., 2008)

2. UTJEČE LI TIP MODIFIKACIJE GENA NA SPEKTAR ABERANTNIH DOGAĐAJA?



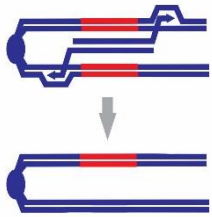
Insercije

→ duplikacije ciljnog kromosoma

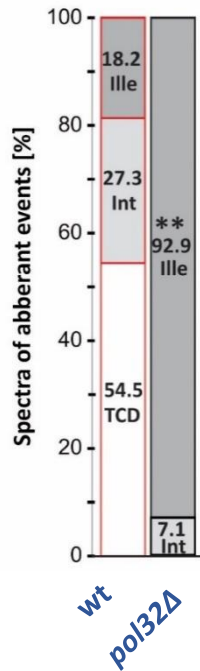
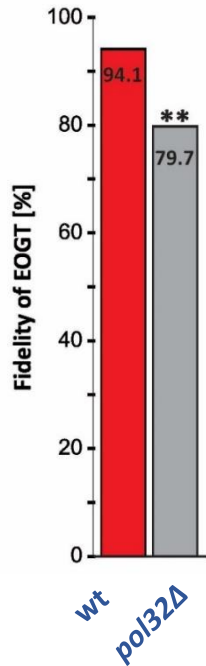
Zamjene i delecije

→ nasumične integracije, adicije, duplikacije ciljnog kromosoma, kompleksni događaji

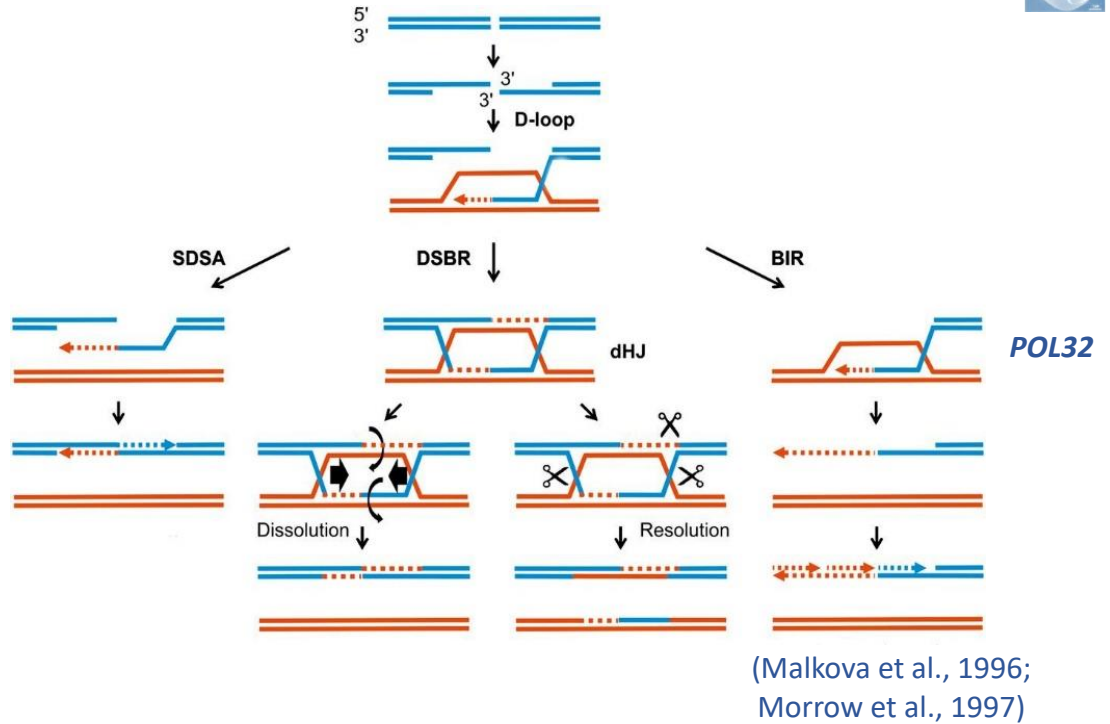
3. KOJIM MEHANIZMOM NASTAJU DUPLIKACIJE KROMOSOMA?



neodjeljivanje
(Kaye et al., 1997)



ili



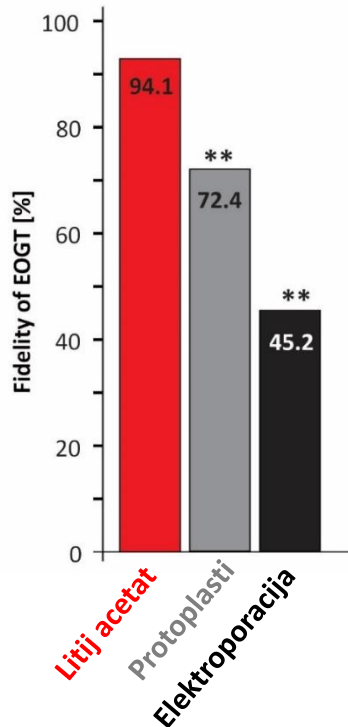
Duplikacije kromosoma nastaju replikacijom DNA potaknutom dvolančanim lomom (BIR) → popravak homolognom rekombinacijom

4. UTJEČE LI METODA UNOSA DNA NA POSTOTAK GENSKOG CILJANJA?



Metode za unos DNA u stanice kvasca:

- kemijska - pomoću litijevog acetata
- enzimska - uklanjanje stanične stijenke (protoplastiranje)
- fizikalna - primjena kratkog strujnog pulsa



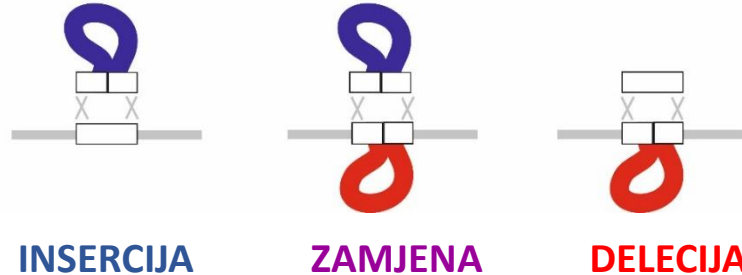
Metoda unosa DNA značajno utječe na postotak genskog ciljanja (i spektar događaja)

Štafa i sur., 2017

Stres → oštećenje DNA → hiperrekombinacijski fenotip?

KOMET TEST





1. Veća je uspješnost genskog ciljanja ako se fragmenti insertiraju u genom ili ako zamjenjuju ciljani alel.
2. Modifikacija bio koje regije može rezultirati nastankom nepoželjnih promjena u genomu poput **duplikacija ciljnog kromosoma**, nastanka **direktnih i raspršenih ponavljanja** ili **kromosomskih rearanžmana**. Nužno je potvrditi prisustvo modificiranog i odsustvo nemodificiranog alela.
3. Metoda unosa DNA značajno utječe na postotak genskog ciljanja.

Hvala na pažnji!!!!



prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec

doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

doc. dr. sc. Bojan Žunar

Nataša Tomašević



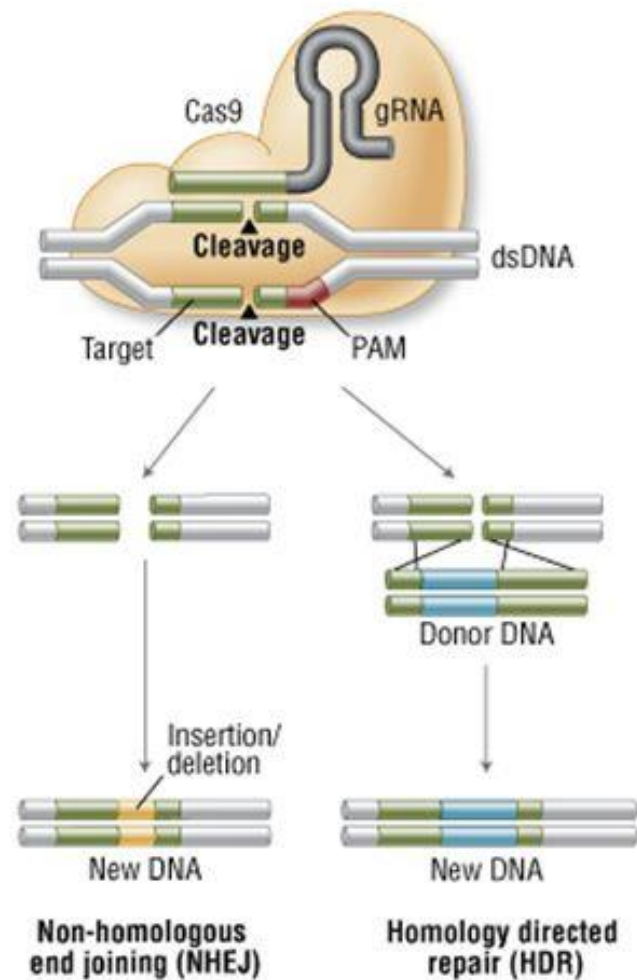
prof. dr. sc. Lorraine S. Symington



dr. sc. Goran Gajski

NOVA NADA ZA USPJEŠNU GENSKU TERAPIJU LJUDI?

CRISPR/Cas9 (+ HOMOLOGNA REKOMBINACIJA)



INAKTIVACIJA

INSERCIJA