

INCE - wykład 6

Instytut Informatyki, Politechnika Warszawska
Instytut Matki i Dziecka w Warszawie

Tomasz Gambin

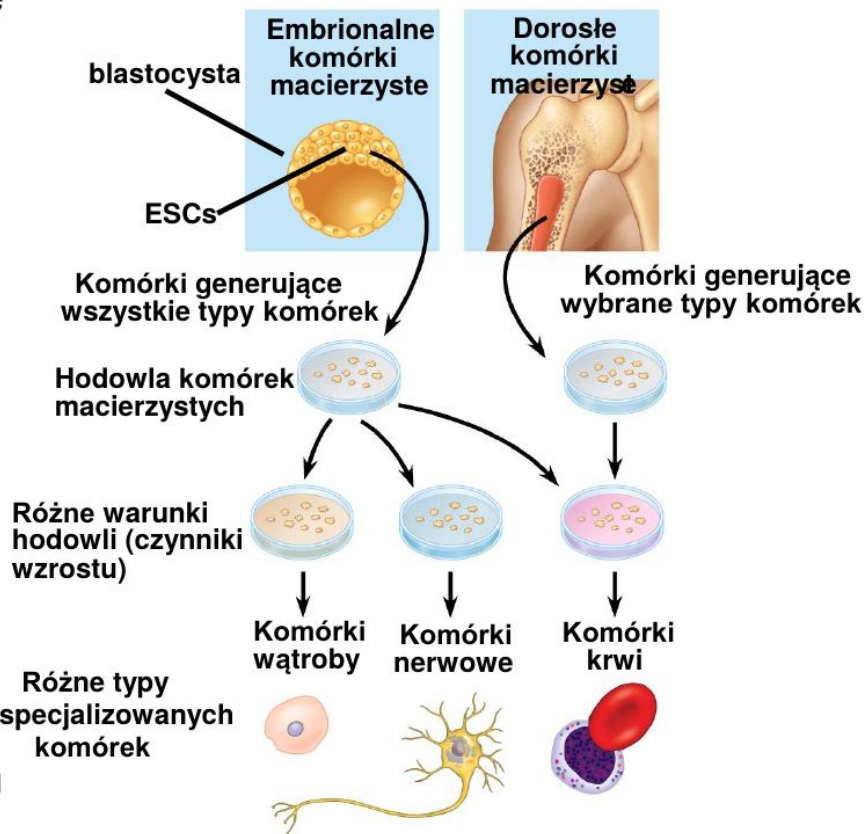
na podstawie prezentacji **dr hab. n med. Michała Mikuli**

Komórki macierzyste

► **Komórka macierzysta** (ang. *stem cell*) – komórka zdolna do potencjalnie nieograniczonej liczby podziałów i różnicowania do innych typów komórek

► **Embrionalne komórki macierzyste** (*embryonic stem cells ESCs*) - komórki izolowane na wczesnym etapie embriogenezy gdy zarodek jest w formie **blastocysty**

► **Doroste komórki macierzyste** - znajdujące w tkankach dorosłych organizmów, gdzie zasiedlają **niszę** chroniącą je oraz utrzymującą ich stan i potencjał do różnicowania



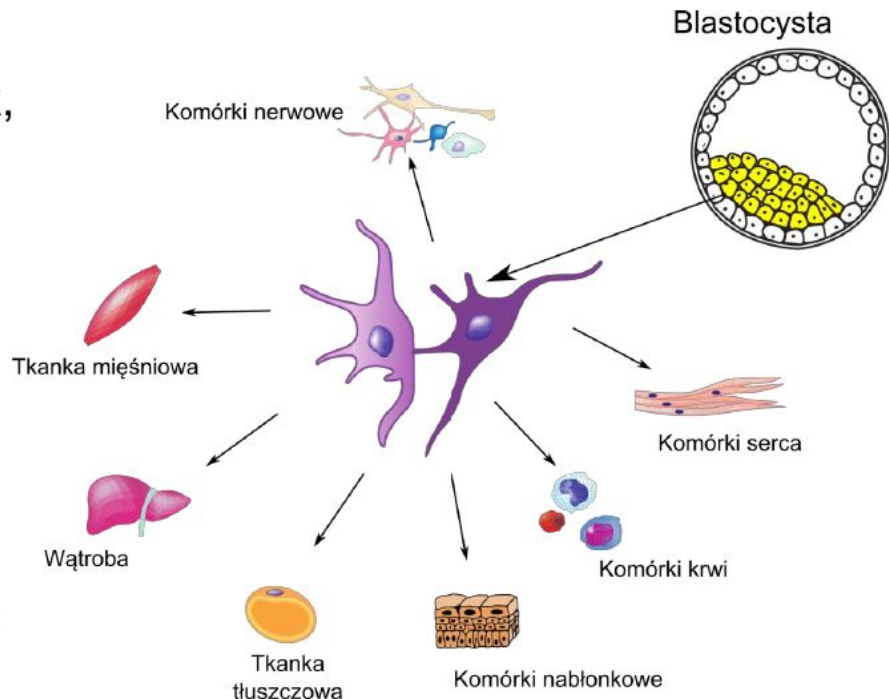
Komórki macierzyste

► Ze względu na zdolność do różnicowania komórki macierzyste dzieli się na:

► **totipotentne** – takie, które mogą ulec zróżnicowaniu do każdego typu komórek, w tym komórek tworzących łożysko

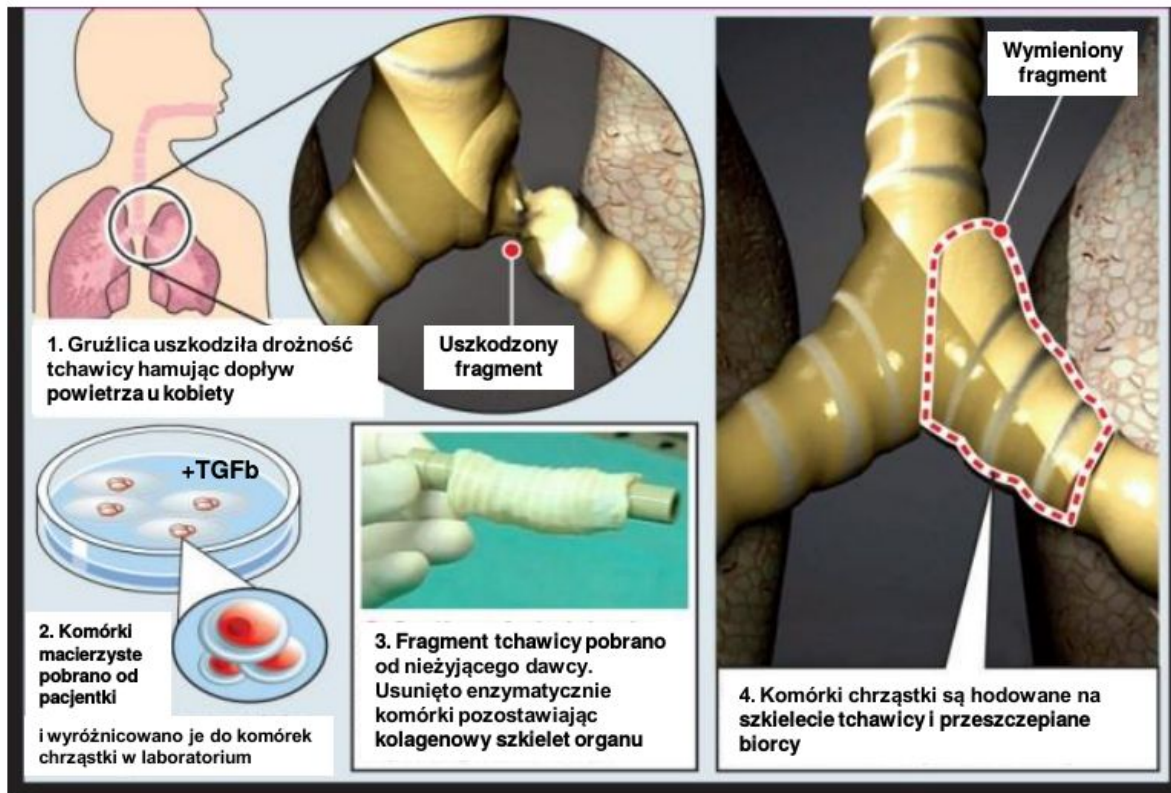
► **pluripotentne** – takie, które mogą dać początek każdemu typowi komórek dorosłego organizmu z wyjątkiem komórek łożyska

► **multipotentne** – takie, które mogą dać początek kilku różnym typom komórek, z reguły o podobnych właściwościach



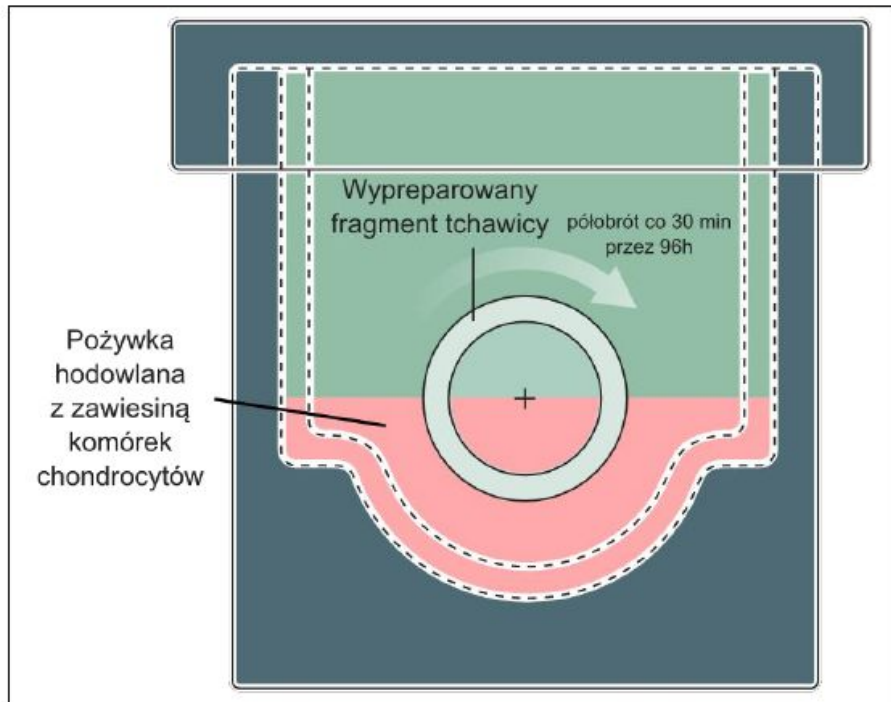
Komórki macierzyste - pierwszy przeszczep

► W 2008 po raz pierwszy przeszczepiono organ wyhodowany z własnych komórek macierzystych pacjenta



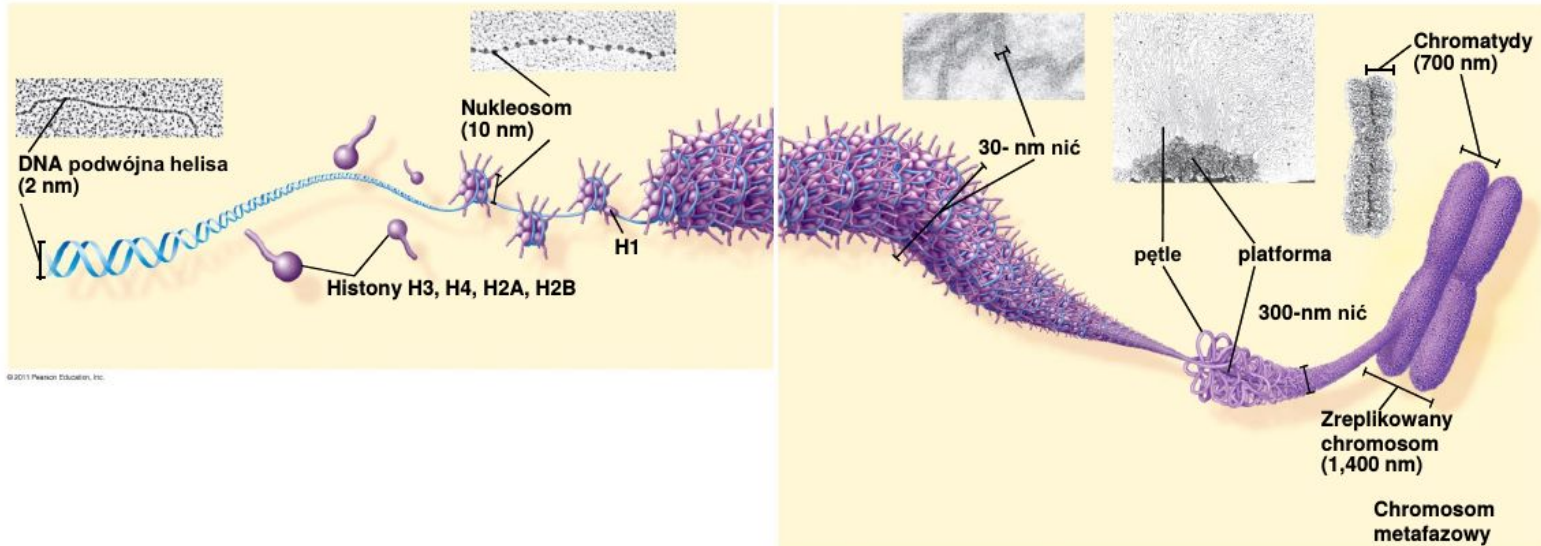
►W **2008** po raz pierwszy przeszczepiono organ wyhodowany z własnych komórek macierzystych pacjenta

►Rycina przedstawia budowę bioreaktora zastosowanego w terapii



► **Reprogramowanie jądrowe** – proces biologiczny, w którym zachodzi przeprogramowanie **chromatyny jądrowej** dorosłej komórki **do stanu pluripotencjalnego**, co umożliwia zmianę losu rozwojowego komórki i wyróżnicowanie jej do innego typu wyspecjalizowanej komórki

► Chromosomy eukariotyczne zbudowane są z **kompleksu DNA i białek** zwanej **chromatyną**, która podlega kondensacji w trakcie podziału komórkowego



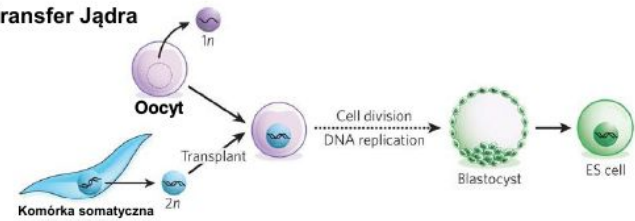
► **Reprogramowanie jądro** – proces biologiczny, w którym zachodzi przeprogramowanie **chromatyny jądrowej** dorosłej komórki **do stanu pluripotencjalnego**, co umożliwia zmianę losu rozwojowego komórki i wyróżnicowanie jej do innego typu wyspecjalizowanej komórki

► **Transfer jądra** – chromatyna jądrowa dorosłej komórki podlega reprogramowaniu po transferze do oocyta, z którego usunięto jądro

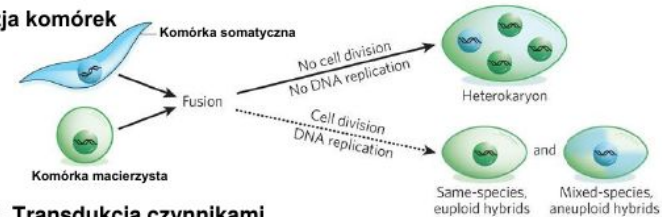
► **Fuzja komórek** – chromatyna jądrowa jest przeprogramowywana przez czynniki obecne w cytoplazmie komórki macierzystej

► **Transdukcja czynnikami transkrypcyjnymi** – dorosłe komórki skóry rosnące na szalkach traktowano plazmidem DNA kodującym macierzyste czynniki transkrypcyjne. Produkty ekspresji genów z plazmidów przetransformowały dorosłe komórki do komórek zwanych **indukowanymi komórkami macierzystymi** ang. *induced pluripotent stem (iPS) cells*

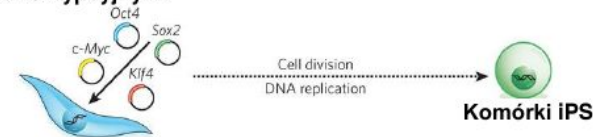
1. Transfer Jądra



2. Fuzja komórek

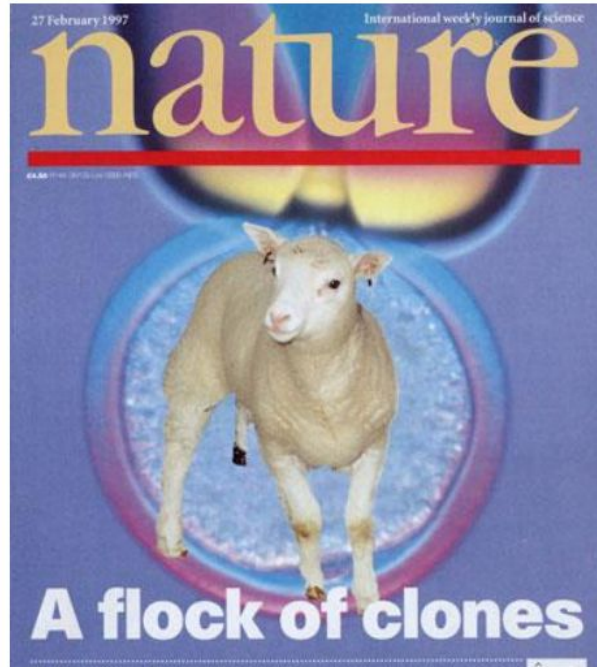


3. Transdukcja czynnikami transkrypcyjnymi



Reprogramowanie jądrowe

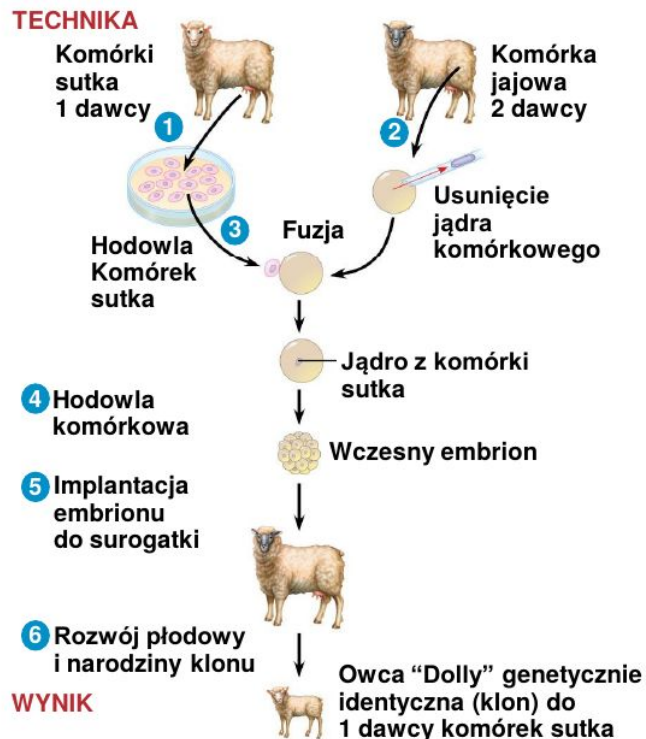
▶ **Transfer jądra** – chromatyna jądrowa dorosłej komórki podlega reprogramowaniu po transferze do oocyta, z którego usunięto jądro. Proces nazywany jest również **klonowaniem terapeutycznym** gdy ograniczy się do etapu embrionu lub **klonowaniem reprodukcyjnym** gdy dojdzie do implantacji w macicy, rozwoju i narodzin



Reprogramowanie jądrowe

► **Transfer jądra** – chromatyna jądrowa dorosłej komórki podlega reprogramowaniu po transferze do oocytu, z którego usunięto jądro. Proces nazywany jest również **klonowaniem terapeutycznym** gdy ograniczy się do etapu embrionu lub **klonowaniem reprodukcyjnym** gdy dojdzie do implantacji w macicy, rozwoju i narodzin

► W 1997 ogłoszono narodziny owcy Dolly sklonowanej techniką transferu jądra z wyróżniczowanych komórek sutka



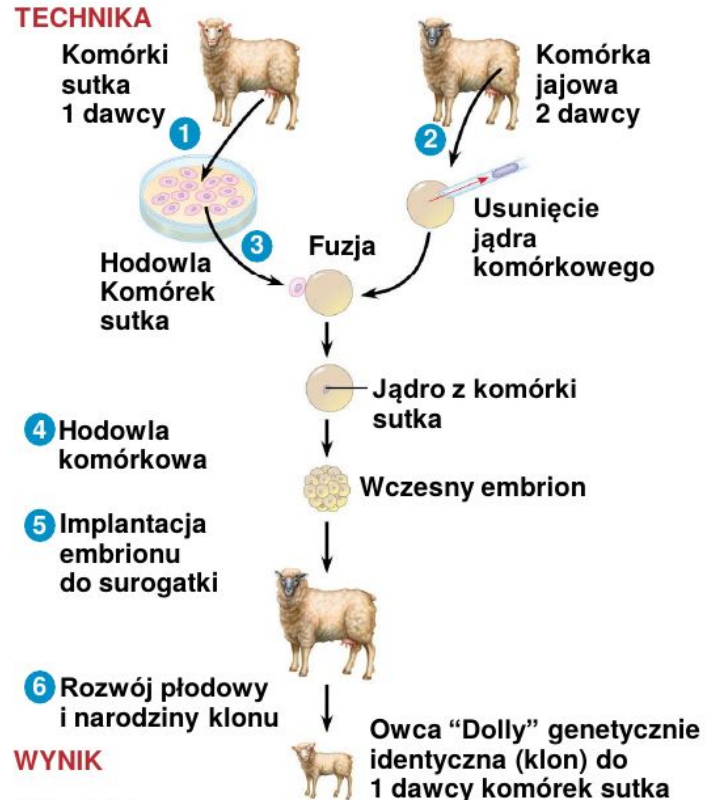
► **Transfer jądra** – chromatyna jądrowa dorosłej komórki podlega reprogramowaniu po transferze do oocyty, z którego usunięto jądro. Proces nazywany jest również **klonowaniem terapeutycznym** gdy ograniczy się do etapu embrionu lub **klonowaniem reprodukcyjnym** gdy dojdzie do implantacji w macicy, rozwoju i narodzin

► W 1997 ogłoszono narodziny owcy Dolly sklonowanej techniką transferu jądra z wyróżniczowanych komórek sutka

► Przedwczesna śmierć Dolly w 2003 oraz zdiagnozowane zapalenie stawów doprowadziły do spekulacji, że jej komórki nie były tak „zdrowe” jak normalnych owiec co spowodowane było niepełnym przeprogramowaniem informacji jądrowej

► W latach 1997 -2007 sklonowano 17 innych gatunków ssaków

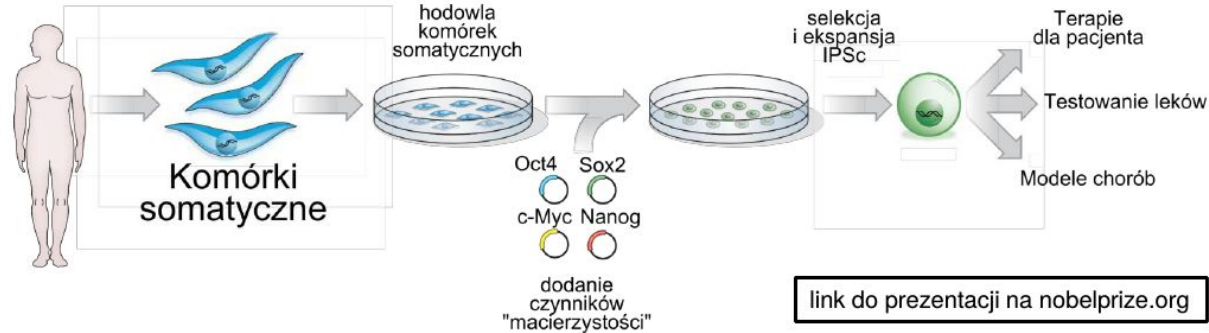
► Klonowanie reprodukcyjne jest ciągle procesem niewydajnym



Indukowane komórki macierzyste

►Komórki macierzyste posiadają charakterystyczne **wzory ekspresji genów**, regulowanych przez specyficzne czynniki transkrypcyjne np. **Oct4, Sox2, c-Myc, Nanog** i inne

►W **2006** naukowcy używając **techniki rekombinowanego DNA** dokonali transformacji komórek skóry plazmidami kodującymi białka „macierzystości”



►Uzyskano **indukowane komórki macierzyste** – komórki posiadające wszelkie cechy embrionalnych komórek macierzystych

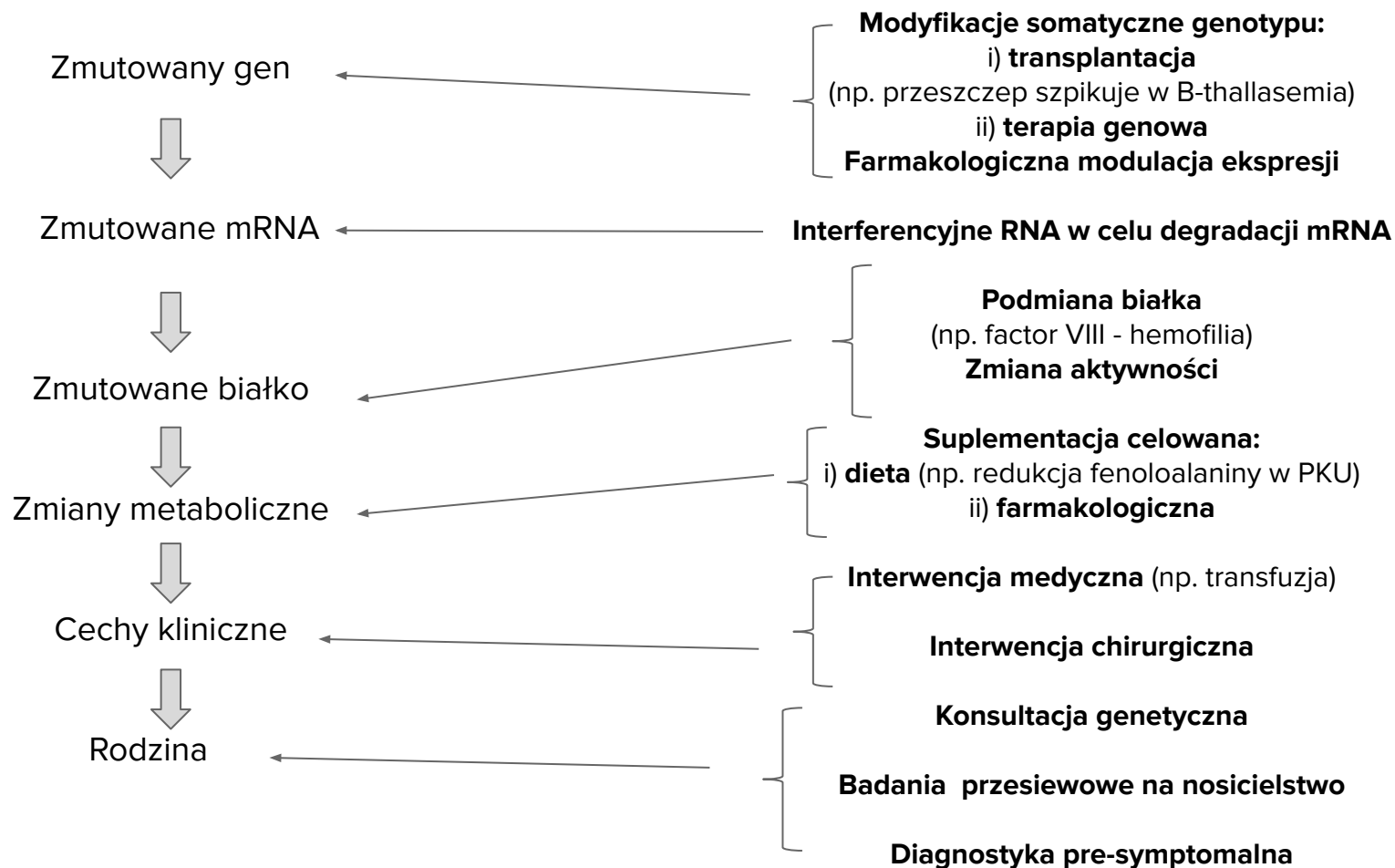
►W związku z kontrowersjami dotyczącymi użycia komórek macierzystych izolowanych z embrionów odkrycie prostej metody indukcji komórek macierzystych z dojrzałych komórek somatycznych uznano za przełom naukowy, który doprowadzi do rutynowego zastosowania iPSc w terapii regeneracyjnej

►Nagroda Nobla **2012** w dziedzinie medycyna i fizjologia dla **Shinya Yamanaki** za iPSc

Indukowane komórki macierzyste

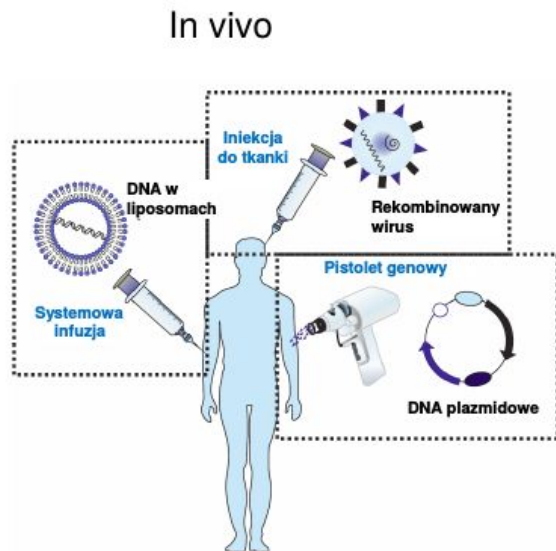
<https://www.youtube.com/watch?v=YdjQz4urDjM>

Strategie terapii chorób uw. genetycznie

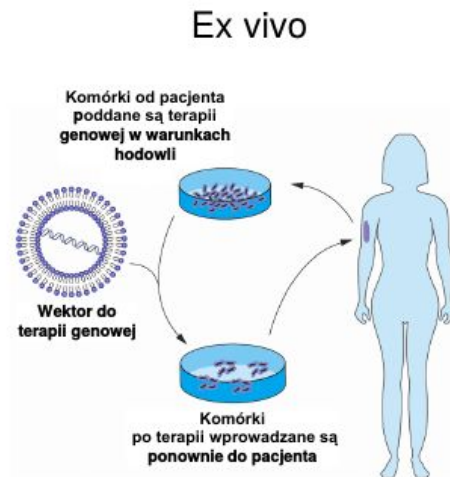


Terapia genowa - podejścia

▶ Istnieją dwa główne sposoby dostarczania kwasów nukleinowych



▶ System dostarczania kwasów nukleinowych specyficznie celuje w wybrane komórki, które mają być poddane terapii



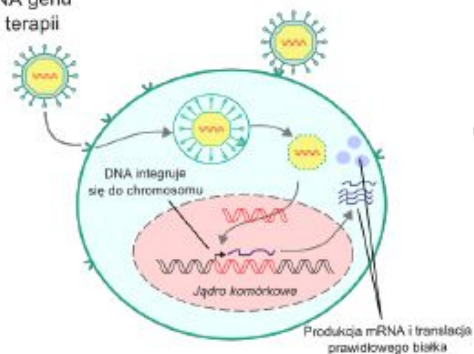
▶ Chore komórki są pobierane i poddane terapii w laboratorium po czym już jako zdrowe są wszczepiane do pacjenta

Terapia genowa - wybór wektorów

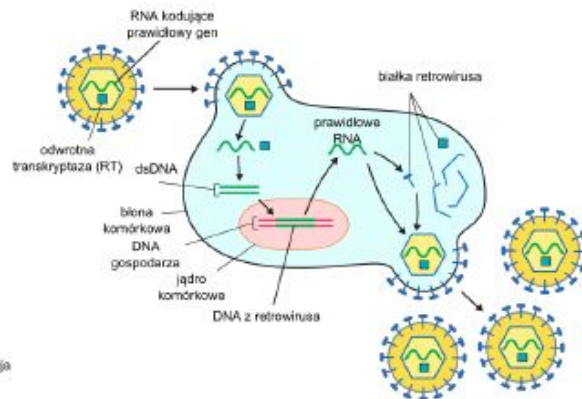
► Wybór wektora do terapii genowej wymaga posiadania wiedzy biologicznej o mechanizmie odpowiedzialnym za chorobę

Adenowirusy DNA

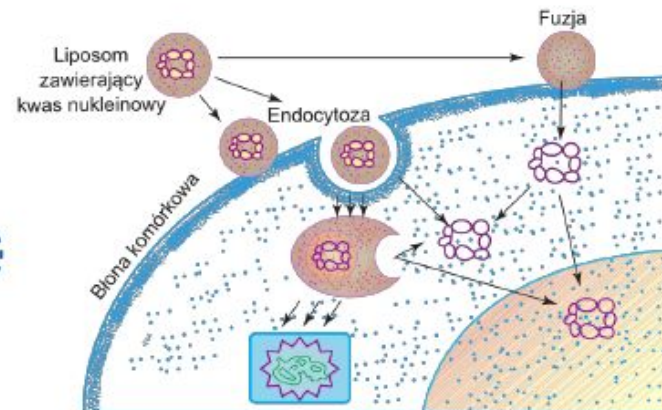
Adenowirus z DNA genu do terapii



Retrowirusy



Liposomy



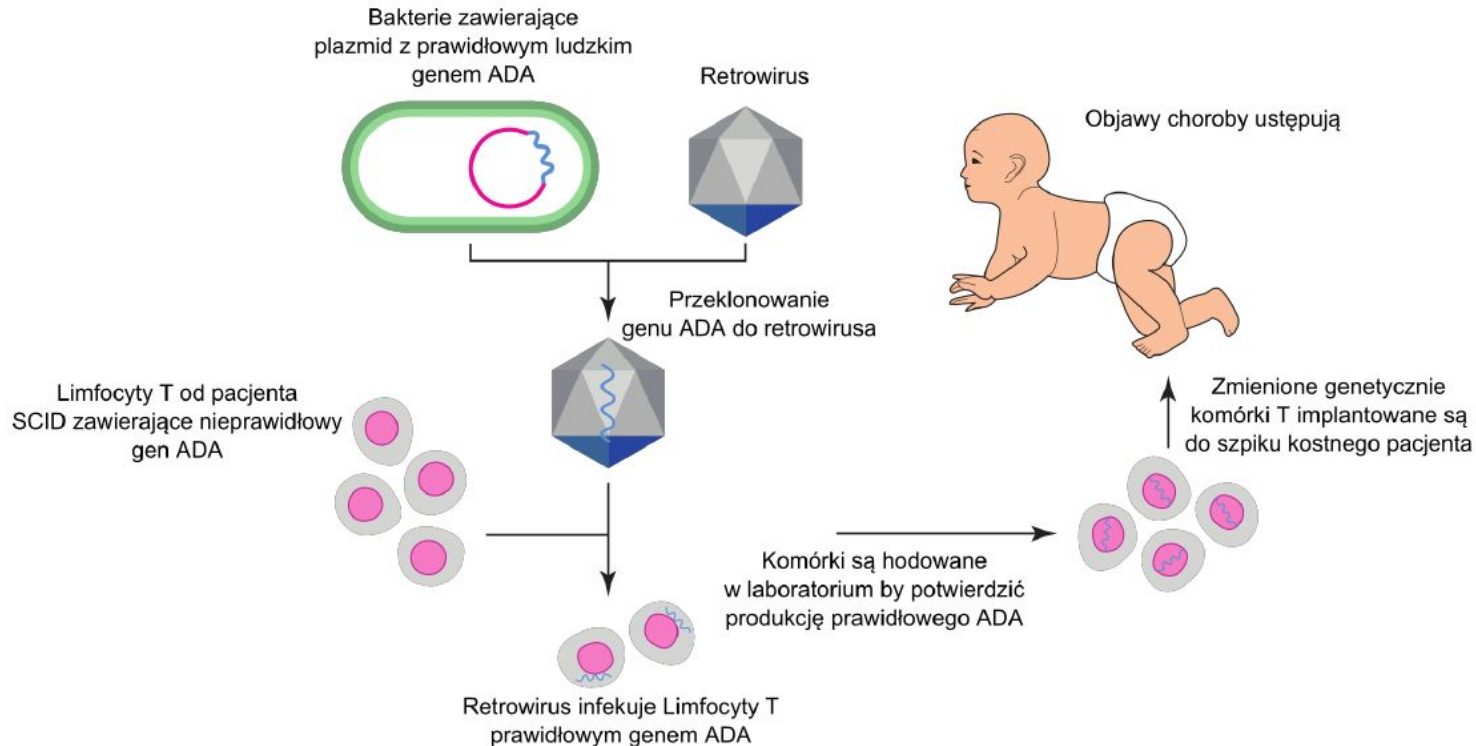
► Powodzenie terapii często wymaga aby wprowadzony gen terapeutyczny był wyrażany do białka przez długi czas. Osiąga się to przez **integrację** genu do genomu wykorzystując fakt, że wektory wirusowe i retrowirusowe posiadają sekwencje umożliwiające włączenie obcego DNA do genomu. Dzielące się komórki przekazują potomnym komórkom ten gen i produkują prawidłowe białko.

Wektory

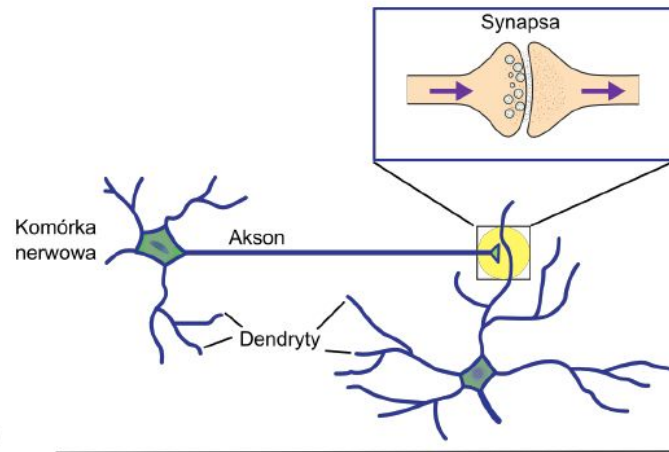
- **Retrowirusy:**
 - Zawierają 3 geny, które mogą być zastąpione genem, który chcemy przetransferować
 - Nowe DNA do 8kb
 - Ograniczone do komórek które ulegają podziałowi
- **AAV (adeno-associated viruses):**
 - Nowe DNA do 5kb
 - Niewielka reakcja immunologicznej
 - Komórki dzielące i niedzielące
- **Adenowirusy**
 - do 35kb nowego DNA
 - Komórki dzielące i niedzielące
 - Silna reakcja immunologiczna (jedna śmierć w badaniach klinicznych)

► **Ciężki złożony niedobór odporności** (zespół SCID ang. *severe combined immunodeficiency disease*), wywołwana przez mutację w genie kodującym **deaminazę adenozyńską (ADA)**. ADA produkowana jest w limfocytach T i degradowuje kwasy nukleinowe.

► Chorzy cierpią z powodu nawracających infekcji o podłożu wirusowym, grzybiczym oraz bakteryjnym; obserwuje się u nich także opóźnienie rozwoju fizycznego.

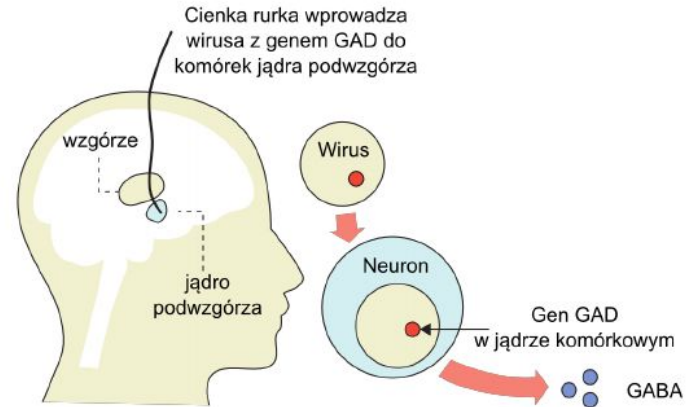


► **Choroba Parkinsona** – niedobór dopaminy, kluczowego neuroprzekaźnika w mózgu. Pojawia się **nadczynność nerwów w jądrze podwzgórza** w mózgu prowadząca do dalszego spadku poziomu dopaminy



► Neuroprzekaźniki propagują sygnały nerwowe w otwartych przestrzeniach pomiędzy dwoma sąsiednimi neuronami zwanymi **synapsami**

► Gen **dekarboksylaza kwasu glutaminowego (GAD)** produkuje **kwas gamma-aminomasłowy (GABA)**, neuroprzekaźnik, który naturalnie hamuje nadczynność nerwów w jądrze podwzgórza w mózgu



Zmiana ekspresji genów

- ▶ **Interferencja RNA** – naturalne zjawisko wyciszania albo wyłączenia **ekspresji genu** przez dwuniciowy RNA (dsRNA) o sekwencji komplementarnej do DNA wyłączanego genu
- ▶ Krótkie 21 – 30 pz RNA
- ▶ Micro-RNA (**miRNA**) oraz krótkie interferujące RNA *small interfering* (**siRNA**)

- ▶ Wyłączenie może się odbywać przez
 - ▶ degradację mRNA
 - ▶ blokowanie translacji mRNA

- ▶ Zjawisko iRNA zostało zaadoptowane do wielu aplikacji w badaniach podstawowych i biotechnologii. Technologia iRNA ma również duży potencjał terapeutyczny – **hamowanie ekspresji niepożądanych genów**

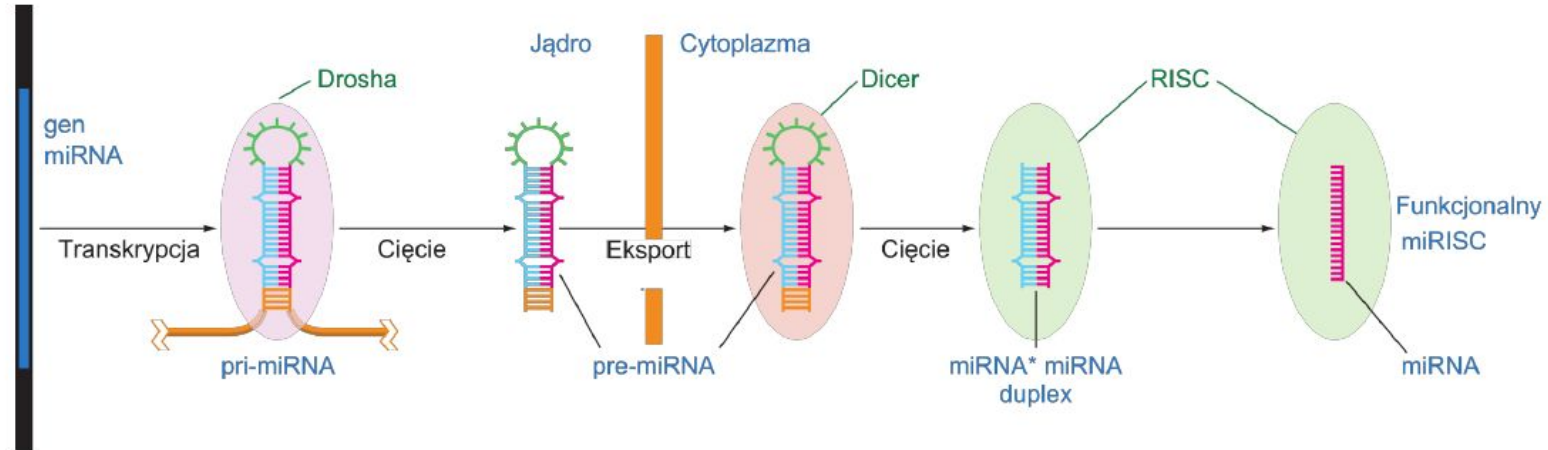
- ▶ Za odkrycie zjawiska interferencji RNA amerykańscy naukowcy Andrew Fire i Craig Mello otrzymali w 2006 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii.

► Powstawanie miRNA

► Kompleks białek **Drosha** wycina trzon miRNA z pierwotnego transkryptu miRNA (pri-miRNA) i powstają pre-miRNA o długości ~ 70 pz

► RNAza **Dicer** przetwarza pre-miRNA do dojrzałego dupleksu miRNA

► Pojedyncza nić miRNA jest włączana do kompleksu białek – powstaje **RISC** ang. *miRNA-induced silencing complex*

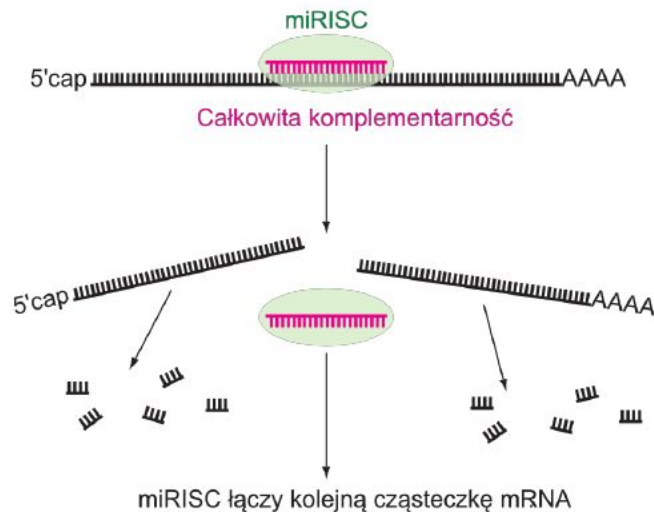


► **Działanie miRNA** – dwa sposoby obniżania ekspresji genów przez rozpoznawanie sekwencji w części 3' mRNA. U człowieka zidentyfikowano >1600 genów miRNA

Gdy komplementarność jest całkowita

- Docelowe mRNA podlega degradacji

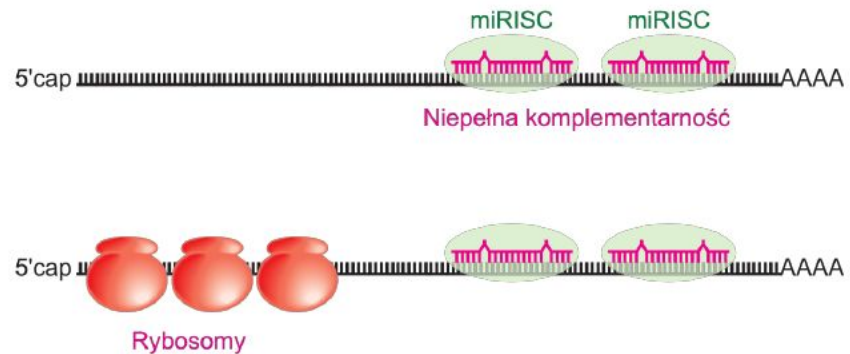
1. Cięcie mRNA



Gdy komplementarność jest niepełna

- Zahamowanie translacji docelowego mRNA

2. Represja translacji

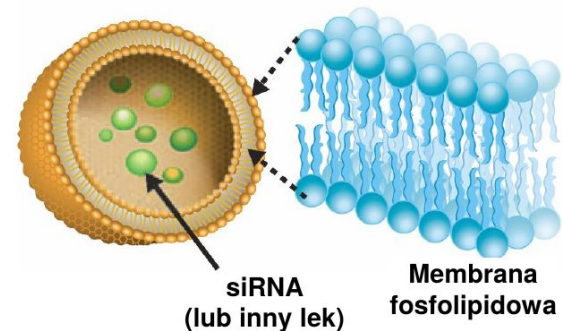
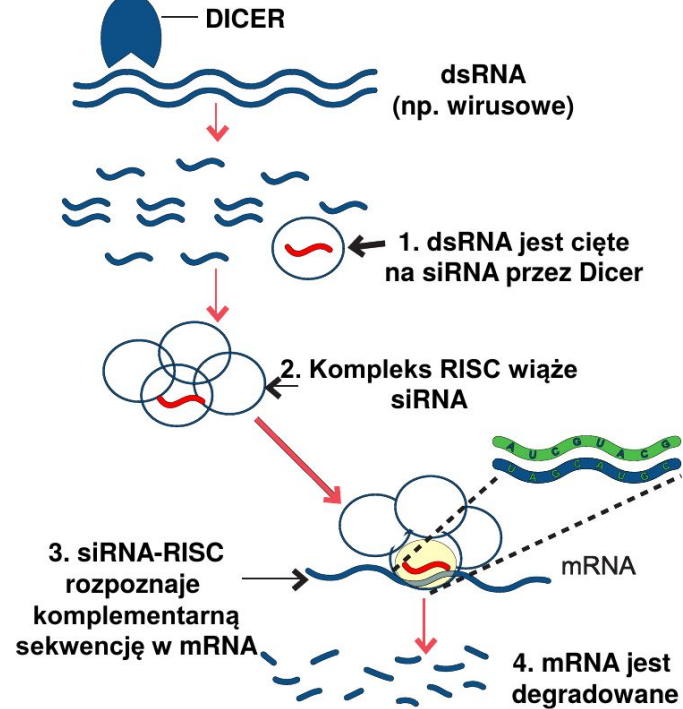


► **Działanie siRNA** – odkryte u roślin, które wykorzystują system interferencji do ochrony przed wirusami RNA

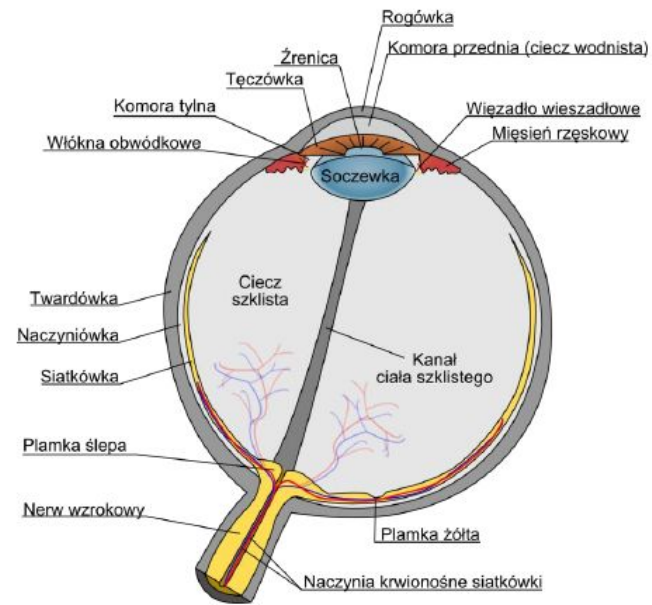
► siRNA są przydatnym narzędziem do selektywnego **wyciszenia genów** w celu np. badania funkcji genu przez obserwację fenotypu molekularnego komórek

► siRNA są używane do terapii chorób, w których dochodzi do nieprawidłowej i niepożądanego ekspresji danego białka

► Ich przydatność wynika ze stosunkowo łatwego i taniego sposobu syntezy i dostarczania z użyciem **liposomów**



- ▶ Obserwowany jest niski poziom efektów ubocznych terapii z siRNA w porównaniu do tych z użyciem wirusów
- ▶ Przykładem skutecznej terapii jest podawanie cząsteczek siRNA skierowanych do mRNA **VEGF** u pacjentów z **zanikiem plamki żółtej**
- ▶ Uważa się, że **powstawanie nowych nieprawidłowych naczyń krwionośnych w siatkówce** odgrywa główną rolę w rozwoju choroby i jest ona **stymulowana przez VEGF** (czynnika wzrostu śródbłónka naczyń)
- ▶ Niekontrolowany rozrost naczyń wywołuje opuchliznę i stan zapalny pogłębiający problem z widzeniem
- ▶ W I fazie prób klinicznych 25% pacjentów, którym podano siRNA, doznało poprawy, a u pozostałych nie zaobserwowano pogorszenia widzenia



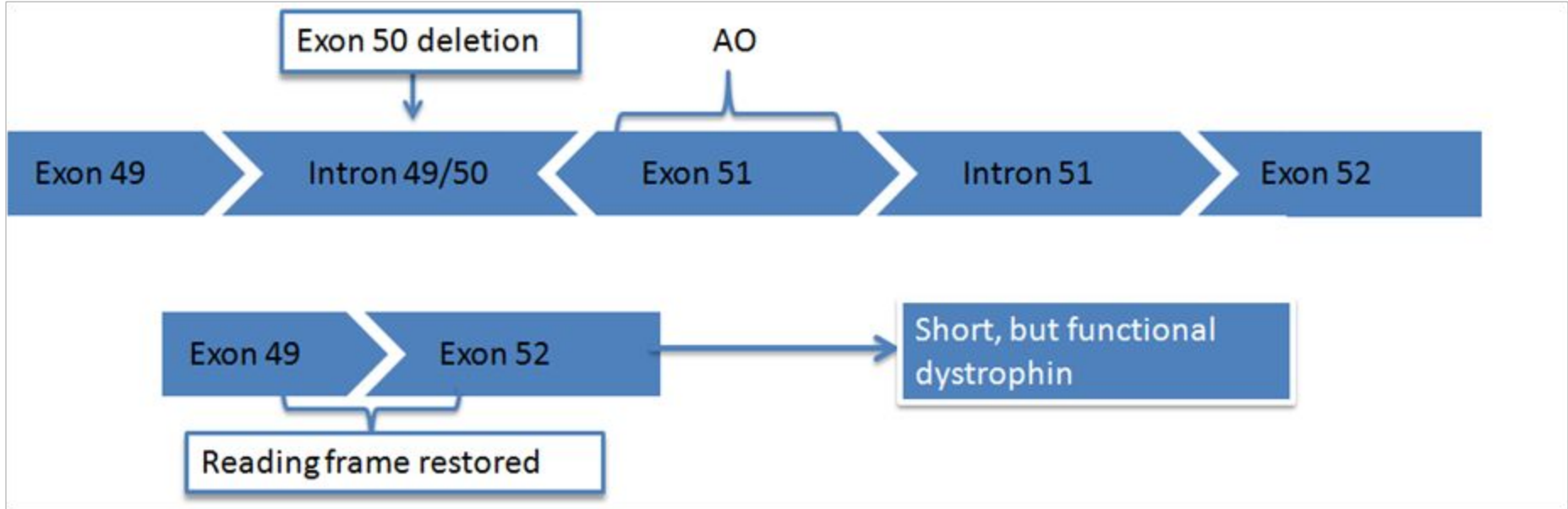
Normalne widzenie



Zanik plamki żółtej



DMD - exon skipping



Ryzyka terapii genowych

- Zła odpowiedź pacjenta na wektor
- Złe wbudowanie się transferowanego genu i potencjalna aktywacja proto-onkogenu - (współcześnie wykorzystywane wektory znacznie zmniejszają ryzyko)
- Inaktywacja istotnego genu
 - Zazwyczaj niegroźne bo raczej rzadkie i może uśmiercić pojedyncze komórki
 - Istnieje jednak ryzyko wbudowania się w złym miejscu transferowanego genu w komórce rozrodczej

Terapie genowe - perspektywy

- Aktualnie prowadzi się > 2000 badań klinicznych wykorzystujących terapie genowe
- $\frac{2}{3}$ z nich dotyczą terapii nowotworowych
- 180 badań dotyczy chorób Mendlowskich

Szczepionki

- <https://www.nytimes.com/interactive/2020/health/oxford-astrazeneca-covid-19-vaccine.html>
- <https://www.irishtimes.com/life-and-style/health-family/explained-a-visual-guide-to-how-the-pfizer-covid-19-vaccine-works-1.4436433>