

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Petra Baráčková

Genová terapie cystické fibrózy

Gene therapy of cystic fibrosis

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Bořek-Dohalská, Ph.D.

Praha, 2017

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lucie Bořek-Dohalské, Ph.D. a veškeré použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Petra Baráčková

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych poděkovala RNDr. Lucii Bořek-Dohalské, Ph.D. za odborné vedení mé závěrečné práce a za trpělivost a ochotu, které mi v průběhu zpracování věnovala.

ABSTRAKT

Cystická fibróza (CF) je autosomálně recesivní onemocnění způsobené mutacemi genu *CFTR* ("Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator"). Jedná se o nejčastější genetické onemocnění v bělošské populaci. V současnosti postihuje přibližně 75 000 jedinců světové populace. CF jakožto monogenní porucha představuje vhodný cíl pro léčbu pomocí genové terapie. Od sekvenování *CFTR* genu v roce 1989 bylo provedeno velké množství preklinických a klinických studií zkoumajících nejrůznější principy této terapie. Cílem předkládané práce bylo provést souhrn dosavadních poznatků a představit nejnovější strategie genové terapie cystické fibrózy, které představují slibný základ pro definitivní vyléčení tohoto onemocnění. Stále se vyvíjející technologie z oblasti genomového inženýrství, prohlubující se znalosti o patogenezi choroby a dosavadní výsledky preklinických a klinických studií motivují vědce k dalšímu testování nových přístupů genové terapie, které by odstranily příčiny této nemoci a trvale ji vyléčily pomocí zásahu do lidského genomu.

Klíčová slova: cystická fibróza, *CFTR* gen, CFTR protein, genová terapie

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by mutations in the membrane protein called cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). It is the most frequent genetic disease in Caucasian populations. It currently affects approximately 75,000 individuals worldwide. CF as a monogenic disease represents an appropriate target for the gene therapy. Since the sequencing of the *CFTR* gene in 1989, a large number of preclinical and clinical studies have been performed examining the various principles of this therapy. The aim of this review study is to summarize the findings and introduce the latest strategies of the gene therapy of cystic fibrosis, which represent a promising basis for definitive cure of this disease. The evolving technologies of genomic engineering, deepening knowledge in pathogenesis of this disease and the results of preclinical and clinical trials motivate researches to further testing of the gene therapy strategies, which have the potential to eliminate the cause of the disease and cure it by intervening in human genome.

Keywords: cystic fibrosis, *CFTR* gene, CFTR protein, gene therapy

OBSAH

Seznam zkratk	7
1 ÚVOD	9
2 CÍL PRÁCE	10
3 PŘEHLED LITERATURY	11
3.1 Cystická fibróza	11
3.2 Příznaky cystické fibrózy	11
3.2.1 Obecné symptomy	11
3.2.2 Patogeneze dýchací soustavy	12
3.2.3 Patogeneze trávicího ústrojí	14
3.2.4 Patogeneze rozmnožovací soustavy	14
3.3 Struktura a funkce CFTR proteinu	15
3.4 CFTR gen a jeho mutace	18
3.5 Léčba cystické fibrózy	22
3.6 Genová terapie	24
3.6.1 DNA přenos CFTR genu	25
3.6.1.1 Virové přenašeče	25
3.6.1.2 Nevirové přenašeče	29
3.6.2 RNA přenos CFTR genu	33
3.6.3 Editace CFTR genu	34
3.6.3.1 "ZFN" technologie	35
3.6.3.2 "TALEN" technologie	37
3.6.3.3 "CRISPR/Cas9" technologie	38
3.6.4 Editace CFTR RNA	40
3.6.5 Terapeutické využití kmenových buněk	40
3.7 Vyhledky do budoucna	42
4 ZÁVĚR	44
5 SEZNAM LITERATURY	45

SEZNAM ZKRATEK

AAV	adeno-asociovaný virus (z angl. Adeno-associated virus)
ABC	"Adenine nucleotide-binding cassette"
ASL	plicní povrchová kapalina (z angl. Airway surface liquid)
BMSC	kmenové buňky z kostní dřeně (z angl. Bone marrow-derived stem cells)
CaCC	vápníkem aktivovaný chloridový kanál (z ang. Calcium-activated chlorid channel)
CAR	"Coxsackie-adenovirus receptor "
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CF	cystická fibróza
CFTR	"Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator"
CRISPR	"Clustered regularly interspaced short palindromic repeats"
crRNA	CRISPR RNA
DC-Chol	3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethan)-karbamoyl]-cholesterol
DSB	štěpení dvoušroubovice (z angl. Double-strand break)
DOPE	1,2-dioleoylfosfatidyletanolamin
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan
DOTMA	N-[1-(2, 3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chlorid
ENaC	"Epithelial Na ⁺ channel"
F/HN	fúzní/hemaglutinin-neuramidasový (z angl. Fusion/Hemagglutinin-neuraminidase)
HDAd	adenoviry závislé na pomocníkovi (z angl. Helper-dependent adenoviruses)
HDR	homologicky řízená oprava (z angl. Homology-directed repair)
hMSC	lidské mezenchymální kmenové buňky (z angl. human mesenchymal stem cells)
iPSC	indukované pluripotentní kmenové buňky (z angl. induced pluripotent stem cells)
MSD	transmembránová doména (z angl. Membrane spanning domain)
NBD	doména vázající nukleotidy (z angl. Nucleotide-binding domain)
NHEJ	nehomologické spojení konců (z angl. Non-homologous end-joining)
ORCC	"Outward rectifying chlorid channel"
PAK	proteinkinasa A

PCL	meziřasinková kapalina (z angl. Periciliary liquid)
pDNA	plazmidová DNA
PEG	polyethylenglykol
PEI	polyethylenimin
PKC	proteinkinasa C
PLL	poly-L-lysin
PTC	předčasné terminační kodony (z angl. Premature termination codons)
SecR	"Serpin-enzym complex receptor"
SeV	Sendai virus
sgRNA	jediná vedoucí RNA (z angl. Single-guide RNA)
SMaRT	spliceosomem zprostředkovaný RNA trans-sestřih (z angl. Spliceosome mediated RNA trans-splicing)
SV40	Simian virus 40
TALEN	"Transcription activator-like effector nuclease"
TLR	Toll-like receptor
tracrRNA	trans-aktivační CRISPR RNA
ZFN	nukleasa s motivem zinkového prstu (z angl. Zinc-finger nuclease)

1 ÚVOD

Cystická fibróza (CF) je rozsáhlé chronické onemocnění, kterým trpí přibližně 75 000 jedinců ve světové populaci [1]. Přestože se jedná o nejčastější monogenní dědičnou poruchu v bělošské populaci [2], je o ní v naší veřejnosti známo jen velmi málo. První zmínky o projevech nemoci existují již po mnohá desetiletí, klinicky byla však nemoc popsána až na počátku 20. století [3].

Nemoc je způsobena mutacemi genu *CFTR* (z angl. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který kóduje stejnojmenný chloridový kanál. Jelikož se tento protein vyskytuje v epitelálních buňkách téměř všech orgánů v lidském těle, onemocnění postihuje komplexně prakticky celý organismus. Typickým projevem CF je tvorba hustého hlenu, který je hlavním původcem komplikací, většinou s fatálními následky [4]. Nejčastější příčinou smrti je selhání plic v důsledku chronických bakteriálních infekcí a zvyšující se vazkosti sekretu, který nakonec znemožní v dýchacích cestách přenos kyslíku [5].

CF je geneticky podmíněné onemocnění, není tedy možné ji vyléčit bez zásahu do lidského genomu. Objevení *CFTR* genu roku 1989 [6] umožnilo zavést principy tzv. genové terapie, jejímž cílem je pomocí různých metod obnovit funkci *CFTR* kanálu. V současné době zatím nebyl žádný z postupů prokázán jako stoprocentně účinný, CF tedy zůstává nemocí nevléčitelnou. Do budoucna jsou však předpovídány vyhlídky na trvalé odstranění příčin nemoci, a tedy její úplné vyléčení.

Než bude objevena nejvhodnější metoda genové terapie, je potřeba intenzivně léčit symptomy nemoci. Jelikož je CF v organismu velice rozsáhlým onemocněním, tak i její léčba se skládá z mnoha procedur, které potlačují jednotlivé projevy. Symptomatická léčba je tedy dost náročná, avšak právě velké pokroky v léčbě příznaků, zpomalování progresu nemoci a zároveň včasná diagnostika významně prodlužují dobu života pacientů od původně nedožítých 10 let v 60. letech minulého století [2] v průměru až na 40 let [7].

Pacienti potřebují nejen trvalou péči zdravotníků ve specializovaných CF centrech, ale také podporu rodiny a nejlépe i širšího okolí. V současné době existuje mnoho nadací a klubů, které sdružují pacienty trpící cystickou fibrózou a pomáhají nemoc rozšířit do povědomí veřejnosti [4].

2 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky v oblasti genové terapie cystické fibrózy, popsat nejnovější metody terapie zavedené v posledních desetiletích a pokusit se předpovědět možné pokroky a směry, kterými by se mohl dále tento způsob léčby ubírat.

3 PŘEHLED LITERATURY

3.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) je vrozené geneticky podmíněné onemocnění způsobené mutací genu *CFTR* (z angl. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který kóduje stejnojmenný chloridový kanál, zodpovědný za transport a vstřebávání elektrolytů. Kromě vysokého obsahu solí v potu, který dal chorobě laický název "nemoc slaných dětí", se CF projevuje chronickými infekcemi dýchacích cest, poruchami trávicího traktu a u 98 % mužů způsobuje neplodnost. Přestože patogeneze choroby je velmi rozsáhlá, nedochází zpravidla k postižení mozku, u pacientů tudíž nebývají evidovány projevy duševního opoždění. Nemoc také nezasahuje do fyziologického fungování svalové soustavy [4].

Genetická mutace $\Delta F508$, která způsobuje vynechání fenylalaninu v poloze 508 a která nejčastěji chorobu vyvolává, se objevila přinejmenším před 53 000 lety. Po mnoho století byla nemoc spojována s čarodějnictvím [8], neboť bylo známo pouze to, že děti, jejichž pot chutnal slaneč, umíraly v raném věku, příčina byla však neznámá. Nemoc byla poprvé vědecky popsána v roce 1938 americkou lékařkou Dorothy Anderson [3].

Cystická fibróza je nevyléčitelné a smrtelné autosomálně recesivní onemocnění, postihující 1 z 2500 narozených bělošských dětí [9]. V České republice byl z posledního celostátního CF novorozeneckého screeningu (2013) stanoven počet nově nakažených jedinců na 1 ze 4023 novorozenců, což činí přibližně 30 nových pacientů ročně [10].

Ačkoliv je cystická fibróza v současné době nevyléčitelná, je léčitelná. S dokonalejšími způsoby léčby se také zvyšuje průměrný věk pacientů s CF, v dnešní době se ve většině vyspělých zemí pohybuje kolem 40 let [7].

3.2 Příznaky cystické fibrózy

3.2.1 Obecné symptomy

Cystická fibróza je komplexní onemocnění postihující mnoho orgánů jako jsou slinivka, žlučník, játra, střeva, rozmnožovací ústrojí a zejména plíce [11]. Kromě nervové a svalové soustavy tedy postihuje téměř celý lidský organismus a mimo zánětů výše uvedených orgánů může také například vyvolat poruchy růstu nebo způsobit cukrovku [4].

V některých zdrojích můžeme nemoc nalézt pod označením mukoviscidóza, které vyjadřuje nápadnou vazkost hlenu (mucus – hlen, viscidus – vazký), která je pro CF charakteristickým znakem [4,12] a způsobuje značné obtíže především v dýchacích orgánech (viz kapitola 3.2.2), také ale může způsobit zažívací komplikace blokadí trávicího traktu (viz kapitola 3.2.3).

Dalším typickým příznakem je zvýšený obsah soli v potu v důsledku poruchy reabsorbce soli epiteliálními buňkami. Populární metodou k diagnostikování CF je tzv. "potní test", který nemoc spolehlivě odhalí přibližně u 98 % pacientů. Objevují se však případy, kdy mají nemocní koncentraci chloridu v potu v normálu [13]. V takových situacích je potřeba při podezření na CF provést jiná vyšetření, například na správnou funkci jater a žlučníku nebo na přítomnost typických patogenů v plicích. U mužů se často testuje přítomnost spermií ve spermatu, neboť nemocní bývají ve většině případů azoospermičtí [14].

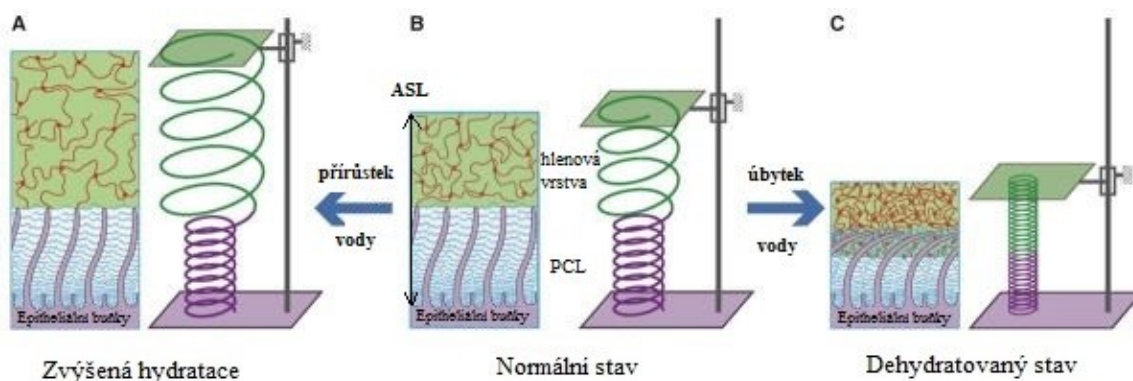
3.2.2 Patogeneze dýchací soustavy

Chronická onemocnění plic jsou nejzávažnějšími projevy CF a v 85 % případů jsou příčinou úmrtí pacienta [15,16]. Hlavní terapeutické cíle jsou tedy zaměřeny především na zlepšení ochrany a funkce dýchacích cest.

Primárním obranným mechanismem v dýchacích cestách člověka je tvorba hlenu, který zachytává a obaluje vdechnuté mikroorganismy a částice. Ty jsou následně společně s hlenem transportovány pomocí pohybu řasinkového epitelu do dutiny ústní, aby mohly být z těla vyloučeny. Pod vrstvou viskózního hlenu se nachází kapalná složka, která se nazývá meziřasinková kapalina (PCL, z angl. Periciliary liquid). Tyto dvě složky se souhrnně označují jako tzv. plicní povrchová kapalina (ASL, z angl. Airway surface liquid). PCL je řidší vodnatá vrstva, která umožňuje volný pohyb řasinek, které se svými špičkami zanořují do vrstvy hlenu, aby s ním mohly pohybovat. Zároveň také PCL brání naleptání hlenu, který obsahuje muciny a jiné proteiny, na sliznici [17].

Výška, složení a vlastnosti ASL jsou striktně regulovány [9]. Aby mohl celý tento obranný mechanismus fungovat, musí být umožněn pohyb řasinek v celé jejich délce. To je zajištěno konstantní výškou vodnaté PCL, která se pohybuje mezi 6-7 μm , které odpovídají délce natažené řasinky [18] (obrázek 1B, strana 13). K regulaci konstantní hodnoty výšky PCL významně přispívá hlen. Mezi PCL a vrstvou sekretu existuje osmotická rovnováha, na jejímž základě se mezi tyto složky rozděluje voda. Hlen může na rozdíl od PCL měnit svůj

objem v závislosti na množství vody v bronchiálních dutinách. Pokud tedy dojde k hydrataci ASL, voda přednostně vstupuje do hlenové vrstvy (obrázek 1A). Na druhou stranu při dehydrataci může hlen ztratit část svého objemu ve prospěch PCL, aby byla zachována její výška [19] (obrázek 1C).



Obrázek 1: Schématické znázornění vlivu hydratace a dehydratace na rozložení ASL. Plicní epiteliální buňky jsou pokryty tenkou vrstvou plicní povrchové kapaliny (ASL), která zahrnuje vrstvu hlenu a meziřasinkovou kapalinu (PCL), zajišťující pohyb řasinek v celé jejich délce (obr. 1B). Aby byl zachován konstantní objem PCL, při zvýšené hydrataci voda přednostně vstupuje do hlenové vrstvy (obr. 1A), naopak při dehydrataci může hlen ztratit část svého objemu ve prospěch PCL (obr. 1C). Převzato a upraveno z publikace [19].

Objem vody v ASL udává množství rozpuštěného chloridu sodného, na jehož regulaci se podílí sodíkový kanál ENaC (z angl. Epithelial Na^+ channel), který je ve zdravých buňkách inhibován funkčním CFTR proteinem. Pokud je chloridový kanál nefunkční nebo úplně chybí, dochází k poruše zpětného vstřebávání chloridů buňkami, což má za následek hyperabsorpci sodíkových iontů [20]. Sodík má však vlastnosti houby – váže na sebe vodu z tekutin [4], v tomto případě z ASL. To má v první řadě za následek snížení objemu hlenu, následně dochází k odčerpání vody také z PCL. Zahuštěný hlen lne k řasinkovému epitelu a znemožňuje pohyb jednotlivých řasinek. To způsobuje selhání obranného mechanismu dýchacích cest a vdechnuté částice nemohou být tímto způsobem odstraněny [19].

Hustý nepohyblivý hlen se stává prostředím vhodným pro bakteriální infekce (nejčastěji *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a bakterie rodu *Burkholderia*) [21]. Při napadení plic bakteriemi aktivuje imunitní systém neutrofilů, které jsou sice určeny k potlačení infekce, nakonec však jen podpoří poškození dýchacích cest. Vylučují totiž

v nadměrném množství elastasu, která štěpí strukturální proteiny plicní tkáně, a tím ji značně poškozuje [22]. Navíc se neutrofilové po splnění své funkce rozpadají, přičemž se uvolní velké množství DNA. Ta se začlení do hlenovité složky, čímž dojde k jejímu ještě většímu zahuštění [23]. Čím hustší je hlen, tím hůře skrze něj proniká kyslík, až se vrstva stane neprodyšnou.

3.2.3 Patogeneze trávicího ústrojí

Také v trávicím systému je jednou z hlavních příčin obtíží hustý hlen, který je pro CF tak charakteristický. Dochází tak ke zúžení či ucpání vývodů a trubic gastrointestinálního traktu.

Mezi typické příznaky CF patří poruchy slinivky břišní, která je jedním z nejraněji a nejzávažněji zasažených orgánů. Nefunkčnost CFTR proteinu způsobuje nedostatečnou sekreci trávicích enzymů [24]. Dalším problémem může být transport již vytvořených enzymů na místo určení (tedy do dvanáctníku tenkého střeva) v důsledku ucpání vývodů pankreatu hlenem [4]. Potrava tedy nemůže být dostatečně štěpena, což má za následek nedostatečné vstřebávání tuků, bílkovin a vitamínů rozpustných v tucích. Omezení příjmu základních složek potravy často způsobují poruchy růstu a problémy s udržení přiměřené hmotnosti. Tyto projevy CF se však dají řešit podáváním enzymových a nutričních doplňků stravy [25].

Nejhůře trávenou složkou v tenkém střevě jsou při nedostatku pankreatických enzymů tuky. Snížená aktivita lipas způsobuje steatorrheu [24], což je vysoký obsah tuků ve výkalech [26].

Onemocnění jater jsou třetí nejčastější příčinou úmrtí pacientů s CF [27] a u některých pacientů se projevují cirhózou. Ve žlučníku se mohou tvořit žlučové kameny a také může dojít k abnormálnímu metabolismu žlučových kyselin [28].

3.2.4 Patogeneze rozmnožovací soustavy

Jak již bylo řečeno, u 98 % mužů způsobuje CF sterilitu [4]. Neplodnost ženské populace s CF se pohybuje okolo 50 % [29], nicméně i po úspěšném početí bývá těhotenství rizikové a může být doprovázeno komplikacemi jako například zhoršujícím se zdravotním stavem matky nebo špatným vývojem plodu [30]. Zvýšená exprese CFTR proteinu je u žen spojována s karcinomem děložního čípku a serózní rakovinou vaječníků [31]. Naopak v případě karcinomu prostaty u mužů je exprese CFTR proteinu snížena. Bylo prokázáno,

že snížená exprese CFTR vede k zesílení malignit *in vitro* i *in vivo*, kdežto nadměrná exprese v maligních buňkách snižuje jejich proliferaci a migraci [32].

3.3 Struktura a funkce CFTR proteinu

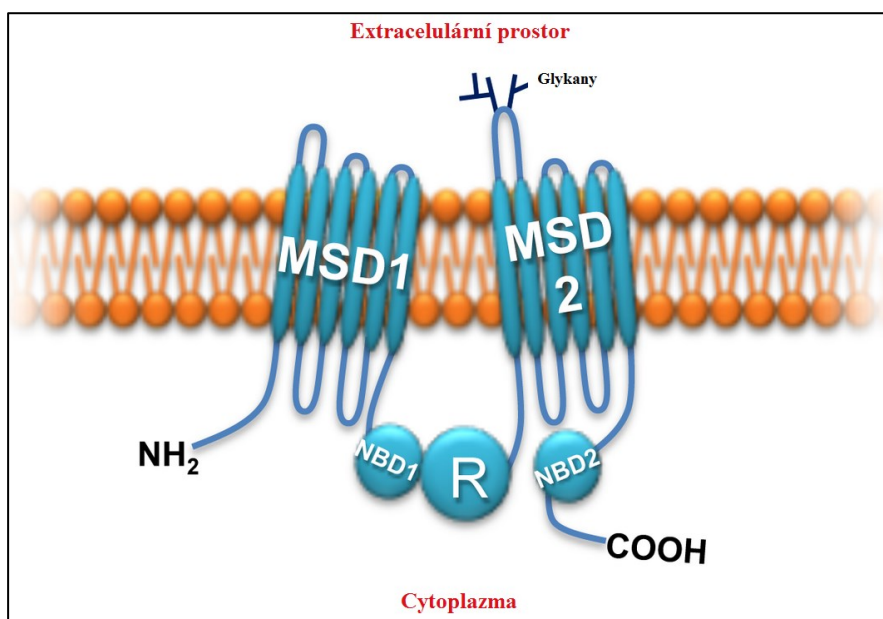
Jak již bylo řečeno, CFTR protein je membránový chloridový kanál. Nachází se na apikální straně membrán především epiteliálních buněk mnoha orgánů, je však exprimován také v některých neepiteliálních tkáních, jako jsou lymfocyty nebo makrofágy [33]. Jedná se o jediný glykoprotein zastávající funkci iontového kanálu v rodině proteinů ABC (z angl. Adenine nucleotide-binding cassette) [34]. Společným znakem proteinů, které se řadí do této skupiny, je transport látek proti koncentračnímu gradientu za současné hydrolýzy ATP. V současnosti je známo 48 transportérů ABC, které jsou rozděleny do 7 podskupin. CFTR protein se řadí do podskupiny ABCC, do níž obecně spadají proteiny zajišťující iontový transport, regulaci sekrece toxinů nebo fungující jako receptory na buněčném povrchu [35].

CFTR protein, sestávající ze 1480 aminokyselin [6], řídí regulaci chloridových iontů pomocí jejich transportu skrz plazmatickou membránu epiteliálních buněk, čímž udržuje homeostázi iontů a tekutin. Absence či nefunkčnost kanálu tedy způsobí blokaci reabsorpce soli a dehydrataci, čímž dojde k tvorbě hustého sekretu, jehož akumulace má za následek vážné obtíže především v plicích a pankreatu [36], o kterých byla zmínka v kapitolách 3.2.2 a 3.2.3.

Strukturně se jedná o symetrický protein, který je tvořen čtyřmi pro ABC transportéry typickými doménami – dvěma transmembránovými doménami (MSD, z angl. Membrane-spanning domain) a dvěma doménami vázajícími nukleotidy (NBD, z angl. Nucleotide-binding domain) [37]. MSD a NBD domény jsou vzájemně spojeny intracelulární smyčkou [38]. CFTR protein navíc obsahuje ještě unikátní pátou doménu, regulační doménu R, která propojuje homologní dvojice motivů MSD-NBD [39] (obrázek 2, strana 16).

Každá MSD doména (v některých zdrojích označována také jako TMD, z angl. Transmembrane domain) se skládá z 6 hydrofobních helixů, které procházejí skrz cytoplazmatickou membránu [40] a vzájemně jsou propojeny intracelulárními a extracelulárními smyčkami [41]. Mezi dvěma MSD doménami se vytváří kanál s nízkou vodivostí (6-10 pS), který selektivně přenáší chloridové anionty přes membránu [39]. Vhodné aminokyselinové složení membránového póru napomáhá hladkému transportu aniontů. Na vnitřních i vnějších koncích domén se nacházejí aminokyseliny s kladně

nabítenými postranními řetězci, které přitahují chloridové anionty do kanálu. Konkrétně se jedná o arginin na extracelulární straně a o lysin na straně intracelulární [42]. Po odstranění jednoho z těchto pozitivních nábojů se dramaticky snižuje rychlost průchodu chloridových aniontů kanálem, což dokazuje důležitost těchto elektrostatických interakcí [43]. Rychlost transportu iontů pórem a vysoká selektivita jsou zajištěny vazbou iontů do charakteristických vazebných míst uvnitř póru. Chloridové anionty vazebná místa obsadí a další vstupující chloridové anionty mohou díky odpudivým silám mezi anionty rychleji postupovat kanálem [44].



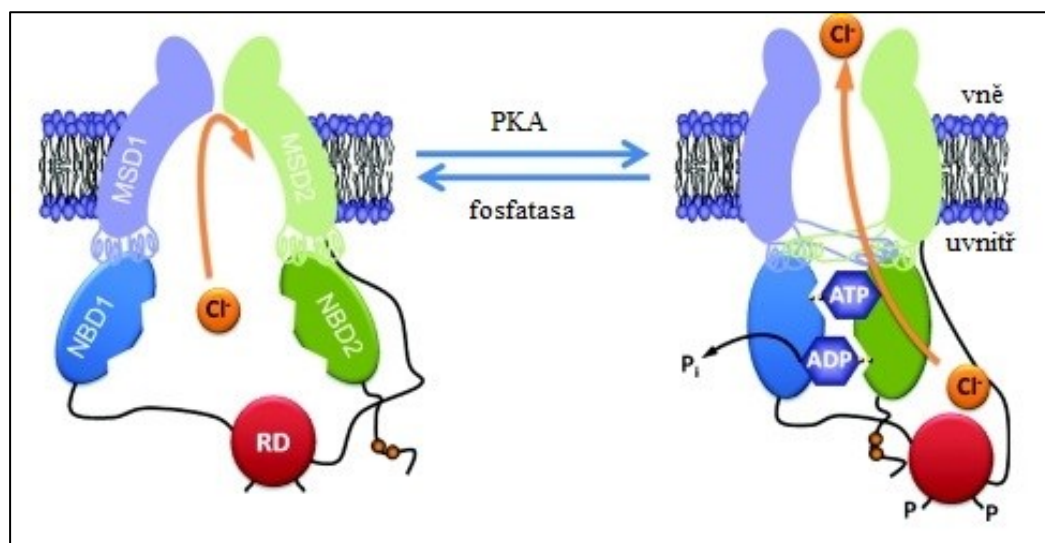
Obrázek 2: Struktura CFTR proteinu. Plasmatickou membránou procházejí dvě transmembránové domény (MSD1 a MSD2). Uvnitř buňky se na ně napojují dvě domény vazající nukleotidy (NBD1 a NBD2) a jedna regulační R doména. Převzato a upraveno z publikace [45].

Aktivita CFTR proteinu je navíc závislá na koncentraci cyklického AMP. Regulační doména proteinu, která odděluje MSD2 a NBD1, obsahuje místa pro fosforylaci cAMP-dependentní proteinkinasou A (PAK) [34,46]. Fosforylace regulační domény je předpokladem pro otevření kanálu [41] (obrázek 3, strana 17).

NBD domény se nacházejí na cytosolové straně buněk a obsahují vazebné místo pro ATP, nefosforylovaná R doména však tvoří sterickou zábranu [47]. Po fosforylaci R domény je umožněna interakce NBD se dvěma molekulami ATP, která způsobí spojení dvou NBD domén do stabilního heterodimeru, svírajícího tyto dvě molekuly ATP ve vazebných místech. Tvorba dimeru vyvolá konformační změny transmembránových domén [41].

K otevření kanálu však dojde až po hydrolýze ATP vázaného na NBD1. Druhé vazebné místo (na NBD2) udržuje ATP vázané a nehydrolyzované po dobu, kdy dochází k průchodu chloridových aniontů. Až hydrolýza druhé molekuly ATP navázané na NBD2 způsobí rozpad dimeru NBD1-NBD2 a deaktivaci kanálu do nevodivého stavu [48–51] (obrázek 3).

Otevírání a zavírání CFTR kanálu je tedy regulováno kinasovou a fosfatasovou aktivitou v buňce a množstvím buněčného ATP. Aktivace cAMP-dependentní proteinkinasy zapříčiní fosforylaci serinových zbytků v R doméně. Následně dochází k interakci NBD s ATP, která způsobí otevření kanálu. Do klidového stavu se kanál vrátí defosforylací R domény proteinovými fosfatasami [39].



Obrázek 3: Mechanismus funkce CFTR kanálu. Nefosforylovaná regulační doména tvoří sterickou zábranu mezi NBD doménami. Fosforylací R domény je umožněna interakce NBD1 i NBD2 s ATP a vytvoření dimeru. Po hydrolýze ATP na NBD1 dochází k otevření CFTR kanálu a transportu chloridových iontů. Převzato a upraveno z publikace [41].

Jak již bylo uvedeno výše, CFTR protein zastává především funkci chloridového kanálu, kromě toho však významně ovlivňuje a reguluje funkce dalších iontových transportérů. S přenosem chloridových aniontů je velice úzce spojena absorpce sodíkových kationtů kanálem ENaC. Kooperace tohoto kanálu s nefunkčním CFTR proteinem má za následek závažnou patogenezi, především v plicích [20] (viz kapitola 3.2.2.).

Mezi další kanály ovlivněné CFTR proteinem patří i jiné chloridové transportéry, jako například vápníkem aktivovaný chloridový kanál (CaCC, z ang. Calcium-activated chlorid channel) [52], nebo ORCC (z angl. Outward rectifying chlorid channel), jehož

aktivita je, stejně jako u CFTR, podmíněna fosforylací cAMP-dependentní proteinkinase A a regulována prostřednictvím ATP [33].

Transport chloridových aniontů prostřednictvím CFTR kanálu je dále úzce spjat s přenosem hydrogenuhličitanových aniontů. CFTR protein stimuluje transport $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. V případě, že je poškozen, dochází ke ztrátě této funkce, což vede k poruchám sekrece hydrogenuhličitanových aniontů a ke snížení pH v povrchové tekutině epitelálních buněk. Tyto dva faktory přispívají ke zvyšování viskozity sekretu [53].

Protein CFTR neovlivňuje pouze iontové kanály. V nedávné době byl prokázán jeho podíl na regulaci sekrece glukagonu v lidských a myších alfa buňkách pankreatu [54]. Dále reguluje aktivitu aquaporinů, které ovlivňují tok vody přes membrány v somatických buňkách. V mužské rozmnožovací soustavě jsou transport vody a optimální koncentrace iontů nutné pro správnou reprodukční funkci. Právě narušení funkce aquaporinů způsobuje v mužské populaci trpící cystickou fibrózou téměř stoprocentní infertilitu [55,56].

3.4 *CFTR* gen a jeho mutace

CFTR gen, který kóduje stejnojmenný protein, byl objeven roku 1989, díky čemuž nastaly velké pokroky v chápání genetiky a patogeneze cystické fibrózy [57]. Gen *CFTR* je umístěn na dlouhém rameni lidského chromozomu 7 (oblast q31.2) a obsahuje 27 kódujících exonů. Po transkripci tohoto genu, který obsahuje přibližně 230 kb, vznikne mRNA přepis o délce 6,5 kb [58,59].

V současné době je v databázi modifikací *CFTR* genu zaznamenáno přes 2000 mutací [60], z nichž nejčastější, kterou nese alespoň na jedné alele 95 % pacientů, se označuje jako ΔF508 . Jak již z názvu vyplývá, tato mutace způsobuje vynechání fenylalaninu v poloze 508 [47]. Dalšími poměrně častými mutacemi jsou G542X, G551D, W1282X, N1303K a R553X. Ostatní modifikace genu se vyskytují s frekvencí menší než 1 % [61].

Na základě vlivu na produkci, funkci nebo stabilitu CFTR proteinu byly mutace genu rozděleny Michaellem Welshem a Alanem Smithem do 4 skupin [37]. V návaznosti na další studia *CFTR* genu a jeho proteinu bylo dělení rozšířeno do 6 standardních tříd. Na jaře loňského roku byla však v publikaci profesora De Boeck a doktorky Amaralové nově klasifikována třída 7 [62,63]. Na obrázku 4 (strana 21) jsou schematicky znázorněny jednotlivé třídy mutací *CFTR* genu s konkrétními příklady mutací. Dále jsou zde uvedeny terapeutické přístupy k léčbě jednotlivých mutací, o kterých bude zmínka v kapitole 3.5.

Klasifikace mutací CFTR genu do jednotlivých tříd:

Třída I

Do první třídy se řadí tzv. "nesmyslné" (z angl. nonsense) mutace, jejichž společným znakem je předčasné ukončení translace CFTR proteinu. Přepis modifikovaného genu nese předčasné terminační kodony (PTC, z angl. Premature termination codons), které zapříčiní, že protein nemůže být syntetizován v celé své délce [64]. Zkrácení proteinu je předpokladem ke ztrátě biologické aktivity a k následné degradaci, což má za následek úplnou absenci CFTR proteinu [65].

Mutace tohoto typu způsobují onemocnění u přibližně 10 % pacientů s CF po celém světě [64]. Patří sem například mutace G542X nebo W1282X [66].

Třída II

Druhá třída zahrnuje mutace, které způsobují chybné modifikace syntetizovaného CFTR proteinu. CFTR protein je již v průběhu translace zanořován do membrány endoplasmatického retikula, kde probíhá jeho glykosylace. V případě mutací II. třídy ale dochází k nesprávné úpravě proteinu, který je následně označen ubiquitinem a degradován v proteasomu [67].

Do druhé třídy spadá výše zmíněná nejčastěji se vyskytující mutace $\Delta F508$ [68].

Třída III

Po posttranslačních modifikacích v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu je CFTR protein transportován k cytoplasmatické membráně, do které je zabudován. Mutace III. třídy, do které se řadí například mutace G551D, znemožňují CFTR proteinu transportovat chloridové ionty [69], neboť v důsledku poškození NBD domén (z angl. Nucleotide-binding domains) není protein schopen hydrolyzovat ATP [37].

Třída IV

Čtvrtá skupina mutací vyvolává modifikace v aminokyselinovém složení transmembránových domén CFTR kanálu (MSD, z angl. Membrane-spanning domain). Protein je tedy schopen hydrolyzovat ATP, díky čemuž mohou být ionty aktivně transportovány přes membránu. Ionty však interagují s proteinem, což má za následek snížení vodivosti CFTR kanálu [70].

Tato skupina mutací je považována za jednu z mírnějších a zahrnuje vzácně se vyskytující R117H, R334W and R234P [71].

Třída V

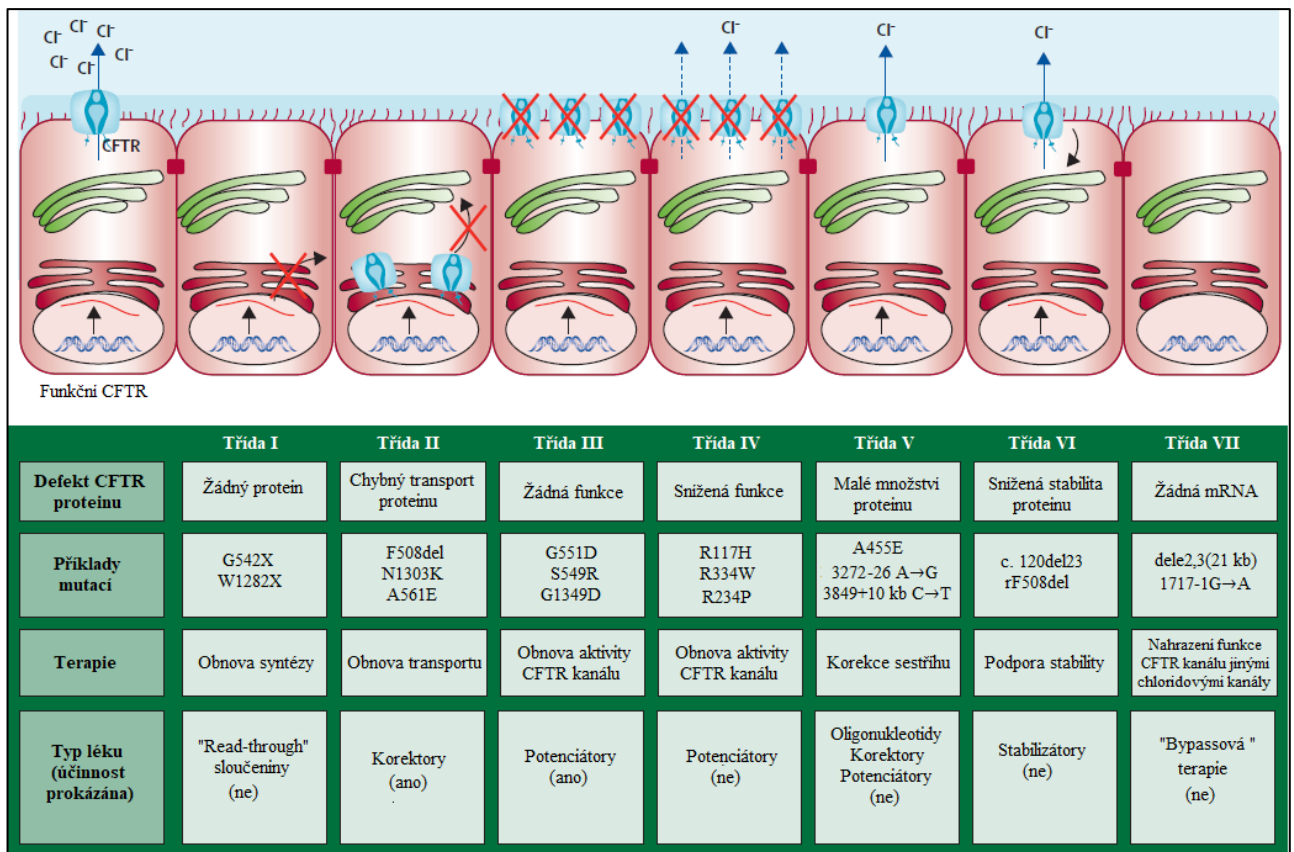
Mutace páté třídy nemají vliv na funkci kanálu, ale redukuje množství proteinu v buňce. CFTR kanál a všechny jeho domény jsou tedy funkční, při syntéze však dochází k chybnému sestřihu [70] a výsledné množství syntetizovaného proteinu je sníženo. Jednou z mutací této skupiny je A455E, která je také považována za mutaci s mírným fenotypem [72].

Třída VI

Šestá třída je poslední skupinou z tradiční klasifikace a zahrnuje mutace ovlivňující stabilitu proteinu CFTR. Labilita proteinu je zapříčiněna absencí 70-98 aminokyselin na C-konci proteinu. Správná struktura C-konce CFTR kanálu není podstatná pro jeho biologickou funkci, ale pro udržení stability komplexu glykosylovaného CFTR. Příkladem mutace této třídy je Q1412X, kde CFTR protein postrádá 70 aminokyselin, čímž způsobuje recidivující plicní infekce a insuficienci pankreatu [73].

Třída VII

Nejnověji zavedená skupina mutací vznikla oddělením od třídy I. Společným výsledkem modifikací *CFTR* genu těchto tříd je absence CFTR proteinu v plné délce z důvodu přítomnosti předčasných terminačních kodonů (PTC). Bylo objeveno, že některé malé molekuly, jako například aminoglykosidy, podporují translaci PTC a napomáhají syntéze funkčního proteinu. Tuto terapii však nelze aplikovat libovolně na kteroukoli mutaci I. třídy, nýbrž musí být individuálně prozkoumána molekulární podstata každé mutace. Podle autorů by měly být modifikace genu, které nelze takovým terapeutickým postupem léčit, zařazeny do zvláštní třídy [63]. Nový návrh se však dočkal mnoha negativních ohlasů, které zastávají již zavedenou tradiční klasifikaci, neboť rozlišit rozdíl mezi skupinou I a VII je více než obtížné [62,74].



Obrázek 4: Klasifikace mutací CFTR genu. Rozdělení mutací CFTR genu na základě vlivu na produkci, funkci nebo stabilitu CFTR proteinu do 7 tříd s příklady mutací jednotlivých tříd a příslušnými terapeutiky. I. třída mutací je charakteristická úplnou absencí CFTR proteinu v důsledku předčasného ukončení syntézy a následné degradace zkráceného proteinu. V případě mutací II. třídy je protein syntetizován v celé délce, jeho následné chybné posttranslační modifikace opět zapříčiní degradaci. CFTR protein nemůže být v tomto případě transportován k cytoplazmatické membráně, do které by měl být zabudován. Mutace III. třídy znemožňují transport chloridových iontů v důsledku poškození NBD domén. IV. skupina mutací způsobuje snížení vodivosti CFTR kanálu v důsledku interakce iontů s proteinem. Mutace V. třídy vedou při syntéze CFTR proteinu k chybnému sestřihu, který je příčinou snížení výsledného množství proteinu. VI. třída mutací ovlivňuje stabilitu CFTR proteinu. Nejnověji zavedená VII. třída vznikla oddělením od třídy I., jejich společným znakem je absence plně syntetizovaného CFTR proteinu. Na tyto nově oddělené mutace však není možné aplikovat terapeutické techniky fungující na některé mutace I. třídy. Převzato a upraveno z publikace [63].

3.5 Léčba cystické fibrózy

Jelikož je cystická fibróza velice komplexní onemocnění, tak i její léčba je velmi rozsáhlá. V současné době je zatím CF nemocí nevléčitelnou, lze ji však léčit intenzivním potlačováním jednotlivých projevů, proto se tento typ léčby označuje jako léčba symptomatická [75].

Významným principem léčby příznaků CF v dýchacích cestách je terapie antibiotiky, která mají za úkol likvidovat bakteriální infekce. Při často opakovaných infekcích plic však nastává vysoké riziko vzniku rezistence bakterií na podávaná antibiotika [76]. V takovém případě je potřeba přistoupit na alternativní způsob léčby, jako je například fágová terapie, při které se bakteriální viry (fágy) aplikují do centra nákazy v plicních buňkách, kde zničí patogenní bakterie [77].

Kromě zánětů vyvolaných bakteriálními invazemi způsobuje poškození plic hustý hlen, který zabraňuje řasinkovému epitelu transportovat cizorodé částice pryč z dýchacích cest, a navíc vytváří vhodné prostředí pro množení bakterií. Proto je dalším principem léčby CF hydratace vazkého sekretu a obnovení objemu plicní povrchové kapaliny, čímž se zajišťuje správná funkce řasinkového epitelu. Jednou z možností je aplikace hypertonického roztoku chloridu sodného *in vivo*. Hypertonický roztok má vyšší osmotický tlak, který využije k nasátí kapaliny z plicního epitelu, a tím zředí dehydratovanou ASL a zvýší její objem. Studie prokázaly, že tato metoda zlepšuje proudění hlenu a uvolňuje dýchací cesty, avšak pouze na 8 hodin. Aby tedy byla léčba účinná, musel by se jí pacient podrobovat několikrát denně [78]. Alternativní metodou je aplikace suchého práškového mannitolu, který se však ukazuje jako ještě méně účinný než hypertonický roztok soli [79]. Obnovení objemu ASL je možné zajistit také regulací iontového transportu. V případě dysfunkce CFTR proteinu je potřeba jeho funkci nahradit aktivitou jiných chloridových kanálů, které zabrání zvýšení aktivity ENaC kanálu, aby nedošlo k hyperabsorpci sodíku a následné dehydrataci ASL [80].

Osvědčenou terapií zlepšující viskozitní vlastnosti hlenu je aplikace DNasy, která degraduje DNA uvolněnou neutrofilů, které se rozpadají po splnění své imunologické funkce. DNasa se rozprašuje jedenkrát denně, což je dávka prokazatelně zlepšující funkci plic a kvalitu života nemocných [7].

Poruchy gastrointestinálního traktu jsou řešeny individuálně dodržováním předepsaných jídelníčků s vysokou energetickou hodnotou a příjmem pankreatických enzymů v podobě kapslí jako doplňku stravy [25].

Symptomatická léčba je velice zdlouhavá, komplikovaná a zahrnuje mnoho různých léčebných metod. Navíc většina procedur vykazuje pouze krátkodobý účinek. Výzkum se tedy mimo zdokonalování symptomatické léčby zaměřuje na tzv. genovou terapii, která má za cíl nemoc trvale odstranit obnovením funkce CFTR proteinu pomocí zásahu do lidského genomu.

Velice důležitou součástí farmakologické léčby CF jsou tzv. CFTR modulátory. Jedná se o malé molekuly, které jsou zaměřeny na konkrétní defekt CFTR proteinu (viz obrázek 4, strana 21). CFTR modulátory je možné obecně charakterizovat jako potenciátory, korektory nebo tzv. "read-through" sloučeniny. CFTR potenciátory umožňují zvýšit transport chloridových iontů skrze správně syntetizovaný CFTR protein zabudovaný do cytoplazmatické membrány. Jsou tedy vhodné k léčbě mutací III. třídy [81], případně také IV. a V. třídy [63]. Nadějným potenciátorem v léčbě CF je ivakaftor (nebo také VX-770), jehož přesný mechanismus působení není detailně známý. Je ale jasné, že stabilizuje CFTR kanál v jeho otevřeném stavu, a tím zvyšuje dobu průchodu chloridových aniontů. Naproti tomu CFTR korektory opravují defekty vznikající při nesprávné maturaci CFTR proteinu a napomáhají jeho správnému zabudování do cytoplazmatické membrány [81]. Mohou být využívány k léčbě mutací V. třídy [63], primárně jsou však cíleny na mutace II. třídy, do které se řadí nejčastěji se vyskytující mutace $\Delta F508$. Bylo prokázáno, že použitím korektoru lumakaftoru byla v plicních buňkách nesoucích tuto mutaci obnovena funkce CFTR proteinu z 15 %. Posledním typem CFTR modulátorů jsou tzv. "read-through" sloučeniny, které podporují translaci předčasných terminačních kodonů (PTC) a napomáhají syntéze funkčního CFTR proteinu v plné délce. V souvislosti s léčbou mutací I. třídy bylo testováno mnoho sloučenin na bázi aminoglykosidových antibiotik jako například gentamicin, který však způsoboval toxické reakce organismu. Další testovanou sloučeninou, která se od aminoglykosidů strukturně zcela liší, je ataluren. Experimentální studie na myším modelu prokázaly potlačení mutace G542X a následné obnovení exprese a funkce CFTR proteinu. Výsledky perorálního podávání atalurenu pacientům trpícím CF v nedávných klinických studiích však zatím neprokázaly významné zlepšení plicních funkcí [81].

3.6 Genová terapie

Genová terapie má jako alternativní léčba genetických onemocnění počátky v 80. letech minulého století. Jejím principem je přenos funkčních genů (také nazývaných transgeny) do cílových buněk, kde nahrazují nebo doplňují geny modifikované [82].

Objevení sekvence *CFTR* genu v roce 1989 a zdokonalující se znalost struktury proteinového chloridového kanálu položily základ genové terapie CF. Cílem této metody je tedy obnovit funkci *CFTR* kanálu buďto náhradou modifikovaného genu pomocí přenosu funkčního genu, nebo potlačením konkrétních mutací genu pomocí jiné strategie, jako je například editace genu. Jako doplněk terapie se využívá manipulace s hladinami elektrolytů a tekutin aktivací alternativních chloridových transportérů, inhibicí absorpce sodíkových kationtů a podobně [34]. Cystická fibróza je jako monogenní porucha ideálním kandidátem pro léčbu genovou terapií. Navíc korekce pouze jedné z poškozených alel je dostačující k odvrácení nemoci [83]. Největší výhodou genové terapie CF (vyjma editace genomu) je, že by měla nemoc léčit nezávisle na druhu mutace *CFTR* genu [11].

Jednou ze strategií genové terapie CF je dopravit do epitelálních buněk *CFTR* gen prostřednictvím cDNA (DNA přenos), nebo již transkribovanou *CFTR*-mRNA (RNA přenos), aby byla zajištěna syntéza funkčního *CFTR* proteinu [1]. K přenosu genetické informace jsou využívány speciální genové nosiče, tzv. vektory, které lze rozdělit na virové a neviróvé. Výběr vhodného vektoru je klíčový pro úspěch terapie a závisí na několika faktorech, jako je velikost přenášeného genu, snášenlivost opakovaného podání a schopnost proniknout do cílových buněk [84].

Primárně je tato terapie cílena na plíce, jejichž poškození je nejčastější příčinou úmrtí pacientů s CF a které jsou ze všech postižených orgánů nejlépe přístupné. Navíc je většina terapeutických látek, které jsou na bázi oligonukleotidů, nevhodná k orálnímu či systémovému podání, proto se zpravidla podávají inhalačně v podobě aerosolu [1].

Třebaže bylo inhalační podání označeno za nejvhodnější, má také několik nevýhod. Plíce vyvinuly jako obranu proti invazi cizích částic řadu mechanických a imunologických mechanismů, které musí genový vektor překonávat. Největší překážkou je nehostinné prostředí dýchacích cest pokrytých vrstvou hustého hlenu, který zabraňuje proudění vzduchu a průniku přenašečů do buněk [84]. Účinnost genové terapie se dále snižuje při již existující infekci plic (například bakterií *Pseudomonas aeruginosa*) [85]. Několik studií prokázalo zlepšení přenosu genů po předchozí léčbě mukolytiky. Obecně platí, že virové vektory překonávají hlenovou bariéru lépe než vektory neviróvé a jsou tedy považovány za účinnější

pro přenos genů. Na druhou stranu imunitní odpověď organismu na virový přenašeč je větší komplikací [86]. Epitel dýchacích cest je tvořen terminálně diferencovanými typy buněk a klíčovým požadavkem genové terapie CF je tedy nutnost opakovaného podávání léčiva, což však zvyšuje riziko negativní imunitní reakce [87].

Bylo zjištěno, že pro normální funkci plic u nemocných je potřeba obnovit aktivitu CFTR kanálu v plicních epitelálních buňkách z 10-35 % [88].

3.6.1 DNA přenos CFTR genu

DNA přenos spočívá v zavedení syntetizované komplementární DNA (cDNA) *CFTR* genu do jádra cílové buňky. Na základě takto vpravené genetické informace by měla být buňka schopná syntetizovat funkční CFTR protein [1].

3.6.1.1 Virové přenašeče

Viry jsou vysoce vyvinuté biologické stroje, jejichž specifickou schopností je pronikat do hostitelských buněk a exprimovat v nich genetickou informaci, kterou nesou [89]. Díky tomu představují ideální vektory pro přenos *CFTR* genu. Jejich největší nevýhodou však je, že v organismu vyvolávají imunitní odpověď, která brání jejich opakovanému podávání, a hrozí riziko inzerční mutagenese.

Mezi virové přenašeče se řadí zatím nejlépe prozkoumané a v praxi aplikovatelné adenoviry a adeno-asociované viry (AAV), dalšími zástupci jsou retroviry, mezi něž patří velmi slibná skupina lentivirů, a další RNA viry, jejichž využití je zatím pouze experimentálně testováno.

DNA viry:

Adenoviry

Prvními virovými vektory, které byly využity v genové terapii CF jen čtyři roky po identifikaci sekvence *CFTR* genu byly adenoviry [90]. Jedná se o zcela přirozené patogeny horních cest dýchacích, jater a vylučovacího ústrojí s dvouvláknovým řetězcem DNA o délce 36-40 kb [91]. Právě díky svému přirozenému tropismu v lidském organismu byly pravděpodobně adenoviry první volbou k přenosu *CFTR* genu [90].

Adenovirové vektory se nezačleňují do genomu hostitele. Do hostitelských buněk pronikají pomocí CAR receptoru (z angl. Coxsackie-adenovirus receptor), který je velice dobře přístupný na apikální straně epitelálních buněk horních cest dýchacích, nikoliv však u buněk dolních dýchacích cest. To může být jedním z důvodů snížené účinnosti transfekce adenoviry [92].

Největším úskalím v aplikaci rekombinantních adenovirů jako virových přenašečů je jejich schopnost vyvolat v organismu hostitele zánětlivé reakce závislé na aplikované dávce. Opětné podání je tedy znemožněno aktivací specifické imunity [91]. Klinické studie, které probíhaly v letech 1993 až 2001, navíc prokázaly o mnoho nižší účinnost genového přenosu, než bylo očekáváno z preklinických modelů. Pouze v některých subjektech byla detekována CFTR mRNA a částečná korekce iontového transportu [93]. I zde však byla účinnost pouze krátkodobá z důvodu vyvolání imunitní odpovědi. Podávání imunosupresiv a kortikosteroidů k potlačení humorální imunity bylo vyhodnoceno jako nepřínosné [92].

V souvislosti s problematikou imunitní odpovědi při opakovaných podáních adenoviru byl vyvinut přístup založený na aplikaci viru, jehož kapsida byla potažena polyethylenglykolem (PEG). Takový adenovirus je pro imunitní systém téměř nedetekovatelný, díky čemuž byla exprese transgenů výrazně prodloužena. Avšak opakované podávání viru potaženého jedním typem PEG vedlo k výraznému snížení genové exprese. Proto byly mezi opakovanými dávkami střídány aktivační skupiny PEG, což opět vedlo ke zvýšení genové exprese [94].

Novějším přístupem a vyvrcholením snahy vyhnout se negativní imunitní reakci bylo vyvinutí tzv. "adenovirových vektorů závislých na pomocníkovi" (HDAAd, z angl. Helper-dependent adenoviral vectors), které jsou zbaveny všech virových genů [95]. Díky tomu mají tyto verze adenovirů vysokou genomovou kapacitu (až 36 kb), na rozdíl od prvních adenovirových vektorů (8 kb), a minimalizují se negativní imunitní odpovědi. Další velkou výhodou je prodloužení exprese transgenů díky minimalizaci imunitní odpovědi [96]. Účinnost transfekce HDAAd vektory byla již před desetiletím prokázána u malých laboratorních zvířat, a to dokonce i při opakovaném podání. Ačkoli tyto preklinické studie odhalily obrovský potenciál, nebyly dostačující k testování u lidského organismu. Další nezbytné studie se proto zaměřily na velká zvířata, konkrétně na prasata, kde byla transfekce také účinná. Po podání aerosolu byla v epitelálních buňkách dýchacích cest prasete zaznamenána účinná exprese transgenů bez známek systémové toxicity [97]. Je proto nutné

usilovat o zlepšení této technologie, aby bylo možné HDAd vektory bezpečně a účinně aplikovat do plic pacientů trpících CF [85].

V současnosti nejsou adenoviry považovány za vhodné vektory pro genovou terapii CF, třebaže se osvědčily v preklinických studiích a napomohly získání mnoha poznatků a vývoji dalších systémů pro přenos *CFTR* genu [83]. Své uplatnění však nacházejí dodnes v jiných terapeutických oblastech, kdy je silná imunitní reakce žádoucí, například při genové terapii rakoviny či při očkování [98].

Adeno-asociované viry

Adeno-asociované viry (AAV) jsou parvoviry s jednovláknovým lineárním řetězcem DNA o délce 4,68 kb. K replikaci v lytické fázi vyžadují AAV přítomnost pomocného viru, kterým bývá nejčastěji nějaký adenovirus nebo herpes virus. V nepřítomnosti pomocného viru projevuje AAV svou schopnost integrovat svůj genom do lidského chromozomu 19q [99,100].

Jako virové přenašeče jsou využívány z několika důvodů. Jelikož nesouvisí s žádnou lidskou chorobou, prokázaly se AAV jako bezpečné, nepatogenní vektory v mnoha klinických studiích [101]. Dalšími významnými vlastnostmi AAV jsou široký orgánový tropismus, vysoká účinnost transfekce a zajištění dlouhodobé genové exprese. AAV jsou navíc, na rozdíl od retrovirů, schopné transfekovat nedělitelné buňky v klidovém stavu [102].

Vektory AAV mají také jisté nevýhody, z nichž nejvýznamnější je právě velmi malá kapacita genomu. Velikostní limit neumožňuje integraci *CFTR* genu v celé jeho délce jediným AAV vektorem [103]. Rekombinantní AAV tedy nejsou schopné po začlenění do lidského genomu zajistit dostatečnou expresi *CFTR* genu, přestože ve zvířecích buňkách transfekovaných tímto genem se podařilo detekovat *CFTR* mRNA [104].

V letech 1999 až 2007 bylo provedeno šest klinických studií, ve kterých byly testovány reakce na aplikaci AAV typu 2 do dýchacích cest pacientů s CF. Prvotní výsledky podpořily tvrzení, že se jedná o zcela bezpečné vektory, zlepšení funkce plic však při rozsáhlejších studiích s opakovaným podáním virového genomu prokázána nebyla [93].

Dalším problematickým faktorem bylo, že u většiny populace se díky opakované expozici AAV, které jsou všudypřítomné, vyskytují již existující protilátky proti jednomu či více AAV sérotypům. Kromě toho, opakované podávání i těchto virových vektorů vyvolává určitou negativní imunitní odpověď [100].

V současnosti je výzkum zaměřen na zlepšení účinnosti AAV [93]. Jako nejslibnější přístup se jeví překonání omezení vyplývající z kapacity genomu AAV vektorů použitím dvouvláknových konstruktů, kdy je přenášený gen rozdělen na dva samostatné vektory [103].

Simian virus

Zatím posledním testovaným vektorovým zástupcem z řad DNA virů je Simian virus 40 (SV40). Jedná se o polyomavirus s kruhovým genomem o velikosti 5,2 kb [105]. Třebaže byl tento vektor považován za potenciálně lepší alternativu adenoviru, právě jeho malá genomová kapacita je značným nedostatkem k transportu *CFTR* genu. Také se objevily kontroverzní výsledky týkající se bezpečnosti tohoto přenašeče, který může potenciálně způsobovat nádorové bujení u zvířat. Pokusy doposud zůstávají v experimentální fázi u laboratorních zvířat, u člověka nebyl tento vektor zatím použit [106].

RNA viry:

Retroviry

Retroviry jsou malé obalené RNA viry, jejichž specifickým rysem je schopnost reverzně transkribovat svou genetickou informaci z RNA do dvouvláknové DNA, která je následně transportována do jádra hostitelské buňky a integrována do genomu. K průniku do buňky tedy retroviry potřebují rozpad jaderné membrány při dělení buněk [98]. Pro svou neschopnost transfekovat nedělitelné buňky se obecně retroviry staly nevhodnými vektory pro genovou terapii CF. Avšak jedna podskupina retrovirů – lentiviry se v nynějším výzkumu ukazuje jako velmi slibná. Atraktivita lentivirů spočívá v tom, že jsou na rozdíl od ostatních retrovirů schopné transfekovat terminálně diferencované plicní epitelální buňky [107]. Genetická informace nesená lentivirem je stabilně integrována do genomu hostitele, čímž je zajištěna exprese po dobu životnosti buňky (pro plicní epitel přibližně 17 měsíců) [108]. Lentiviry nejsou přirozenými patogeny dýchacích cest, tudíž nemají na svém povrchu struktury, které by rozpoznávaly receptory respiračního epitelu [109], což je velkým nedostatkem těchto vektorů. K usnadnění přenosu lentivirového vektoru do cílových buněk je možné využít modulátoru, jako je například lysofosfatidylcholin [106]. Tento přístup však vyvolává obavy o bezpečnost pacientů při převedení do klinických studií, a to především u jedinců postižených chronickými plicními infekcemi [90].

V preklinických studiích byla prokázána stabilní genová exprese v plicích myši, a to i po podání pouze jedné dávky lentiviru obsahujícího F/HN protein (fúzní/hemagglutinin-neuramidasový, z angl. Fusion/Hemagglutinin Neuraminidase) ze Sendai viru. Žádná mutageneze ani jiné projevy toxicity nebyly zaznamenány. Dále byla prokázána možnost opakovaného podávání vektoru bez negativní odpovědi imunitního systému [90]. Na začátku letošního roku byla profesorem Ericem Altonem a spol. publikována studie o přípravě první aplikace pseudotypovaného lentivirového vektoru do lidského organismu. První fáze klinických studií by měla proběhnout ve druhé polovině roku 2017 [110].

Paramyxoviry

Dalšími zástupci z řad RNA virů jsou lidský parainfluenza virus (PIV) a Sendai virus (SeV) patřící do skupiny paramyxovirů, což jsou lidské patogeny respiračního systému s jednovláknovým RNA genomem [111]. Bylo prokázáno, že oba tyto vektory dokáží transfekovat plicní epitelální buňky *in vitro* s vysokou účinností. Sendai virus byl aplikován do hostitelských buněk také *in vivo* a ukázalo se, že došlo k částečné regulaci transportu chloridových iontů. Objevily se ale také dva výrazné nedostatky SeV, a to krátkodobá genová exprese (přibližně 1 týden) a silná imunitní odpověď, znemožňující opakované podávání vektoru [11,86].

Vysoká účinnost při transfekci epitelálních buněk dýchacích cest paramyxoviry je zajištěna prostřednictvím "obalových" proteinů F a HN, které zprostředkovávají vazbu mezi virem a hostitelskou buňkou a uvolňují do ní virovou kapsidu [11]. Právě tyto dva klíčové proteiny jsou využívány k vytváření modifikovaného lentiviru (strana 28), který je v současnosti považován za virový vektor s největším potenciálem [109].

3.6.1.2 Nevirové přenašeče

Nevirové vektory byly vyvinuty jako alternativní forma genového přenosu. Po smrti pacienta v důsledku abnormální imunitní odpovědi po použití virového nosiče během klinických studií v roce 1999 byla značně zpochybněna biologická bezpečnost virových vektorů [112]. Nevirové přenašeče představují nejen bezpečnější variantu, neboť vyvolávají minimální imunitní odpověď i při opakovaném podávání, ale zároveň mohou být průmyslově vyráběny ve velkém měřítku za přijatelné náklady a velikost genetické informace, kterou mohou nést, je prakticky neomezená [113,114]. Jejich nevýhodou je však

poměrně nízká účinnost transfekce, která je způsobena absencí specifické komponenty, která by jim napomohla při vstupu do hostitelských buněk a následně do jejich jader [86].

Nejjednodušším příkladem nevirového přenašeče je samostatná DNA. Ostatní nevirové vektory obsahují kromě nukleové kyseliny nosič, který se na DNA váže prostřednictvím elektrostatických interakcí. Pro genovou terapii CF bylo vyvinuto velké množství nevirových přenašečů, které lze obecně charakterizovat buď jako kationtové liposomy, nebo kationtové polymery [11]. Velkým příslibem posledních let jsou DNA nanočástice.

DNA

Samostatná nukleová kyselina v podobě cirkulární plazmidové DNA (pDNA) je nejjednodušším možným nevirovým vektorem, schopným transfekovat plicní buňky. Použití tzv. "nahé" DNA (z angl. naked DNA) je zajímavé, protože komplexační činidla nosiče mohou zvyšovat toxicitu. Nicméně bez navázaných komplexotvorných nosičů je DNA náchylná k degradaci v extracelulárním i intracelulárním prostoru, ve kterém se navíc velmi pomalu pohybuje, což znesnadňuje průnik do jádra [115].

Kationtové liposomy

Kationtové liposomy jsou vezikuly skládající se z kladně nabitých lipidů, které jsou obvykle v komplexu s cholesterolem a dioleoylfosfatidyletanolaminem (DOPE). Disponují tedy hydrofobní lipofilní a hydrofilní kladně nabitou částí. Díky pozitivně nabitě části jsou schopné vázat negativně nabitou molekulu plazmidové DNA pomocí elektrostatických interakcí [91]. S takto připojenou nukleovou kyselinou vznikají částice zvané lipoplexy [113], které díky hydrofilní části kondenzují do relativně malých útvarů o velikosti v průměru 100-500 nm [109]. Naopak hydrofobní lipidová část napomáhá absorpci na hostitelské buňky a podporuje fúzi s plazmatickou membránou [116].

Výhodou kationtových lipoplexů je rezistence vůči degradaci nukleasami, díky čemuž se zvyšuje úspěšnost přenosu genu [109]. Další výhodou je, že obecně neindukují imunitní odpověď, čímž je umožněno opakované podávání. Navíc je kapacita jejich genomu prakticky neomezená.

První klinická studie, která využila kationtového liposomu, konkrétně DC-Chol/DOPE (3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethan)-karbamoyl]-cholesterol / 1,2-dioleoyl-fosfatidylethanolamin [117]), jako nosiče *CFTR* genu, proběhla roku 1995. Byla prokázána

exprese *CFTR* genu a částečná korekce chloridového transportu. Tento efekt byl nejvyšší 3. den po podání dávky, avšak 7. den vymizel. Význam této studie spočíval v ověření bezpečnosti aplikace liposomálního vektoru bez vyvolání negativní imunitní odpovědi u pacientů trpících CF [118]. Poté následovala studie na myších modelech, při které bylo prokázáno, že po opakovaném podání nedochází ke snižování účinnosti přenosu neviróvým vektorem ani k toxickým reakcím [119].

O čtyři roky později byla provedena první aplikace kationtového liposomu GL67 ("Genzyme lipid" [92]) u pacientů s CF [120]. Tento typ liposomu se v mnoha preklinických studiích ukázal jako vysoce účinný, v myších plicích vyvolal až stonásobnou míru exprese genu ve srovnání s ostatními typy kationtových liposomů [121]. U testovaných pacientů bylo zaznamenáno přibližně 25% obnovení funkce chloridového kanálu, které trvalo 3 týdny [84]. Zajímavým jevem bylo, že téměř všichni pacienti, kterým byl podán komplex GL67/pCFTR, prodělali přechodné chřipkové onemocnění s typickými příznaky (vysoká teplota, bolest hlavy, bolest svalů,...) [120]. Přestože neviróvé vektory obecně imunitní reakci neindukují, imunitní systém člověka vytváří prostřednictvím Toll-like receptoru 9 (TLR9) specifickou odpověď na cizí DNA. Spouštěčem takové reakce jsou sekvence nemethylovaných CpG motivů na bakteriálních a virových DNA. Jelikož plazmidová DNA využívaná v genové terapii je připravena z rekombinantních virů či bakterií, imunitní odpověď hostitelského organismu je očekávatelná [84]. Použitím modifikované nukleové kyseliny oprostěné od CpG sekvence lze tento nedostatek vyřešit [122]. V současnosti je využíván plazmid pGM169, který kóduje lidskou *CFTR*-cDNA a je pro tyto účely zbaven veškerých CpG motivů [123].

Kationtové polymery

Alternativními neviróvými nosiči nukleové kyseliny jsou kationtové polymery. Podobně jako kationtové liposomy mohou také polymery vázat molekulu DNA ke své kladně nabitě části elektrostatickými interakcemi a vytvářet tak kompaktní kondenzované polyplexy odolné vůči nukleasové aktivitě. Elektrostatické síly se také uplatňují při interakci s negativně nabitým povrchem buněk, která vyústí v endocytózu [91].

Nejčastěji využívanými kationtovými polymery jsou polyethylenimin (PEI), poly-L-lysin (PLL), cyklodextriny a polyamidoaminové dendrimery [124].

Polyethylenimin je využíván ve formě rozvětveného polykationtu, který obsahuje primární, sekundární a terciární aminy v poměru 1:2:1. Rozvětvený PEI představuje

efektivní neviróv ý přenašeč, neboť dokáže obejít velký problém genové exprese, kterým je lysozomální degradace transfekovaných vektorů. Existuje mnoho hypotéz. Má se za to, že PEI zvyšuje osmotický tlak uvnitř endozomů, čímž způsobí jejich lyzi ještě předtím, než jsou schopny fúzovat s lysozomy. Vektor PEI tak uniká degradačnímu procesu a je uvolněn do cytoplazmy [125]. Bohužel se ukázalo, že tento způsob odstranění endozomu je pro buňku toxický. Navíc vysokomolekulární PEI komplexy (~ 25 kDa [108]) buňky nedokáží odbourat [91]. Obecně platí, že polykomplexy s vyšší molekulovou hmotností indukují vyšší míru transfekce, zároveň však způsobují vyšší toxicitu [114]. Kromě větveného PEI je také možné využít lineární PEI s nižší molekulovou hmotností (~ 22 kDa [108]). Srovnávací studie ukázaly, že lineární PEI indukuje vyšší expresi transgenu a zároveň je méně toxický, avšak rozvětvený PEI účinněji transfekuje cílové buňky [114].

Poly-L-lysin je dalším kationtovým polymerem, který je testován pro účely genové terapie CF. Na rozdíl od PEI nemá PLL schopnost vnikat do buněk pomocí endozomu, ale vstupuje do nich v komplexu s ligandem, který interaguje s receptorem SecR (z angl. Serpin-enzym complex receptor), který se mimo jiné nachází na apikální straně epiteliálních buněk dýchacích cest. Studie zabývající se aplikací PLL do myších plic prokázaly přibližně dvanáctidenní expresi proteinu a korekci chloridového transportu. Ačkoli samotný PLL neaktivuje imunitní systém, objevila se odpověď na ligand receptoru SecR, což znemožnilo opětovná podání [91].

Velkým příslibem v genové terapii CF jsou kompaktní DNA nanočástice. V podstatě se jedná o jediné kationtové polymery, které již byly použity v klinických studiích. Na počátku tisíciletí byla prováděna studie zaměřená na korekci *CFTR* genu nasální aplikací DNA nanočástic, které se skládaly z jedné molekuly DNA fúzované za použití polyethylenglykolem substituovaného lysinového peptidu [126]. Takto připravené DNA nanočástice lépe pronikají přes hustý hlen v dýchacích cestách pacientů, a navíc bylo prokázáno snížení toxicity na klinicky bezpečnou hladinu. V roce 2014 byl projeven zájem o další vývoj nanočástic. K transportu DNA nanočástic pokrytých vrstvou PEG byly využity polymerní nosiče PEI a PLL, které byly navrženy tak, aby byly dostatečně malé k průniku přes hlenovou vrstvu. Studie prokázala účinný přenos genové informace do buněk dýchacích cest *in vitro* i *in vivo*, aniž by došlo k indukci toxické či zánětlivé reakce [127].

Z předchozího textu je zřejmé, že v 90. letech nastal značný rozvoj neviróv ých přenašečů, avšak následný pokrok ve vývoji nových vektorů byl mírný. O tom svědčí i fakt,

že nejúčinnějším nevirovým vektorem zůstal GL67, který byl použit již v roce 1999 [11,128].

Doposud bylo provedeno celkem 9 klinických studií zabývajících se genovou terapií CF za použití nevirových přenašečů, většinou se ale jednalo o jednorázové studie fáze I/IIa, které studovaly bezpečnost podání vektorů bez posouzení klinického přínosu. V letech 2012 až 2014 proběhla klinická studie fáze IIb, která měla za cíl zhodnotit změny funkce plic u pacientů s CF, kterým byl 1x za měsíc podáván *CFTR* gen s kationtovým liposomem pG169/GL67A8 v délce 1 roku. Byl zaznamenán pozitivní vliv terapie na plicní funkce pacientů trpících CF a neprokázaly se žádné vedlejší účinky. Spíše než o zlepšení funkce chloridového kanálu se jednalo o stabilizaci plicních funkcí pacientů. Přestože se objevily příznivé projevy terapie na plicní funkce, nebyla detekována přítomnost *CFTR* mRNA a nedošlo k obnově funkce chloridového kanálu. Současně používané testy detekující mRNA však nejsou zatím dostatečně citlivé, aby zaznamenaly pouze mírnou expresi vektorové DNA. Ačkoliv nebyla účinnost transfekce velká, jednalo se o první důkaz vlivu nevirové terapie na klinicky významné parametry funkce dýchacích cest pacientů trpících CF [129]. Posun do III. fáze klinických studií se však zatím neuskutečnil.

3.6.2 RNA přenos *CFTR* genu

Myšlenka vnést do epitelálních buněk *CFTR*-DNA a nahradit tak celý modifikovaný gen se objevila již na počátku 90. let. Velkou překážkou se však stal výběr vhodného nosiče, pomocí kterého by bylo možné úspěšně transfekovat cílové buňky a indukovat dostatečnou genovou expresi. Třebaže si viry vyvinuly mnoho strategií průniku do buňky, ukázaly se jako nevhodné vektory z důvodu aktivace imunitního systému hostitele – pacienta trpícího CF. Nevirové vektory sice většinou nevyvolaly imunitní odpověď, jejich schopnost proniknout do buňky však byla minimální. Po překonání buněčné membrány byl dalším kritickým faktorem pomalý transport v cytoplazmě a neschopnost proniknout do jádra (viz kapitola 3.6.1).

Alternativním přístupem k výše popsanému přenosu *CFTR* genu na bázi DNA je využití mRNA jako templátu k syntéze *CFTR* proteinu [130]. To má své výhody. Jelikož k translaci mRNA dochází v cytosolu, není potřeba nukleovou kyselinu transportovat do jádra, čímž lze obejít jednu z nejsložitějších biologických bariér [131]. V souvislosti s touto skutečností je obecně přenos mRNA považován ve srovnání s DNA za účinnější [132].

Navíc je eliminováno riziko inzerční mutagenese, neboť nedochází k integraci nukleové kyseliny do genomu. Další výhodou je, že účinnost mRNA transfekce není podmíněna schopností cílových buněk proliferovat [131].

Ačkoliv přenos genu zprostředkovaný mRNA vyniká mnoha pozitivy, bylo při jeho využití zaznamenáno i několik komplikací. Samotná mRNA je považována za příliš nestabilní molekulu pro terapeutické účely a je tedy nezbytné ji upravit chemickými modifikacemi [133]. Klíčovými faktory pro zvýšení stability molekuly a efektivity následné translace jsou délka polyadenylového konce na 3'-konci a přítomnost čepičkové struktury (m^7GpppN) na 5'-konci. Poly(A) konce stabilních a aktivně překládaných mRNA v savčích buňkách čítají 100 – 250 adenosinů [134].

Dále bylo zjištěno, že *in vitro* transkribované mRNA jsou rozpoznány Toll-like receptory imunitního systémem (konkrétně TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9), což představuje hlavní problém v aplikaci *in vivo*. Snížení těchto negativních imunostimulačních účinků však může napomoci modifikace nukleových bází, které jsou TLR rozpoznány. Modifikované nukleosidy, které mohou snížit imunitní reakci, jsou například pseudouridin, 2-thiouridin, 5-methylcytidin, 6-methyladenosin apod. [132].

Stejně jako DNA jsou i molekuly mRNA přenášeny do cílových buněk pomocí vhodných vektorů, zpravidla nevirových. Jako zástupce polyplexů lze uvést PEI a PLL, z řad kationtových liposomů například DOPE, DOTMA (N-[1-(2, 3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chlorid [135]) nebo DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan [117]), který se zdá být nejúčinnější [132,133]. V posledních letech je využívána strategie kondenzace transfekovaných molekul mRNA do nanočástic pokrytých vrstvou PEG. Studie z roku 2013 poskytla důkaz o účinné transfekci epitelálních buněk dýchacích cest pomocí mRNA [131]. Tento přístup však musí být nadále zkoumán a rozvíjen, než bude moci být uveden do klinické praxe.

3.6.3 Editace CFTR genu

V uplynulých několika letech byly navrženy nové strategie genomového inženýrství, které představují alternativní přístup k nahrazování nefunkčních genů pomocí vektorů, které zatím neprokázalo klinicky významnou a dlouhotrvající expresi přenášené DNA [136]. Jedná se o tzv. editace genomů, což jsou metody, které mají za cíl opravit defektní gen nahrazením přesně stanovené sekvence genu přímo na jeho přirozeném místě

v chromozomu. Hlavními výhodami oprav mutovaného genu jsou zajištění stále trvající exprese a přirozené regulace v buňce a zároveň snížení rizika inserční mutagenese, neboť není využita transfekce nosiči s cizorodou DNA [137]. Na rozdíl od výše uvedených přístupů ke genové terapii CF, které by měly jedním zásahem opravit všechny typy mutací CF, tyto technologie umožňují opravit právě jednu konkrétní mutaci *CFTR* genu [83].

Tyto poměrně nové postupy genového inženýrství jsou založeny na použití uměle připravených nukleas, které jsou navrženy tak, aby v konkrétním místě genomu vyvolaly štěpení dvoušroubovice DNA (DSB, z angl. Double-strand break) [138]. Toto místo štěpení se nachází v blízkosti místa nežádoucí mutace. Poté následuje iniciace endogenních buněčných mechanismů vedoucích k opravě místa štěpení DNA. Tyto procesy mohou probíhat buď jako homologicky řízená oprava (HDR, z angl. Homology-directed repair), nebo nehomologické spojení konců (NHEJ, z angl. Non-homologous end-joining). Výsledkem procesu HDR je bezchybná oprava dvouřetězcového zlomu DNA, neboť jako předloha pro opravu je využit vložený fragment s výraznou homologií k místu štěpení. Naopak NHEJ je proces, který je velmi náchylný k chybám, neboť při prostém spojení dvou konců rozštěpeného vlákna může dojít k vymazání, vložení nebo překrytí určitého úseku DNA [137].

Klíčovým faktorem k úspěšnému využití této strategie je výběr vhodného transportéru nukleas do cílových buněk. Editace genomu má oproti nahrazení celého genu výhodu v tom, že vyžaduje pouze krátkodobou expresi cizorodých komponent v buňce. Jakmile dojde ke štěpení genu, další exprese vektoru není žádoucí. Ideální vektor by tedy měl být krátkodobě působnosti, neintegrovat do genomu, aby bylo sníženo riziko inserční mutagenese, a měl by být schopen efektivně proniknout do cílových buněk. Experimenty byly prováděny především s AAV a lentiviry, v současnosti je kladen velký důraz na použití mRNA [137].

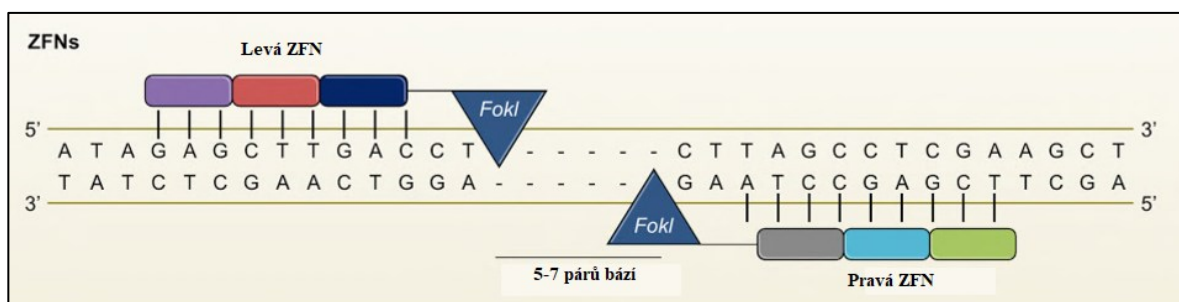
Hlavními technologiemi zabývajícími se editací *CFTR* genu jsou nukleasy s motivem zinkového prstu (ZFNs, z angl. Zinc-finger nucleases), dále tzv. "transcription activator-like effector" nukleasy (TALENs) či CRISPR/Cas9 systémy (z angl. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats).

3.6.3.1 "ZFN" technologie

Zinkový prst (ZF, z angl. Zinc finger) je označení pro strukturní motiv běžně se vyskytující u celé řady proteinů. Umožňuje vazbu těchto proteinů na DNA a vyskytuje se

proto u mnoha tzv. transkripčních faktorů v lidském genomu [139]. Každý motiv zinkového prstu, skládající se ze 30 aminokyselin v konfiguraci $\beta\beta\alpha$, rozpoznává a váže se na sekvenci 3 párů bází. Teoreticky je tedy možné navrhnout takové ZF, které se budou, díky schopnosti rozpoznávání sekvencí v násobcích tří nukleotidů, schopné vázat prakticky na jakoukoli část genomu [138].

První nukleasa s motivem zinkového prstu byla vytvořena roku 1996 fúzí s katalytickou doménou endonukleasy *Fok I* [140]. *Fok I* vyžaduje pro svou nukleasovou aktivitu dimerizaci, tedy dva konstrukty ZFN – jeden se váže na sekvenci bezprostředně před místem štěpení a druhý se váže na komplementární vlákno bezprostředně za místem štěpení. Cílová místa pro vazbu ZF jsou oddělena 5-7 bp dlouhou sekvencí, která je rozpoznána nukleasovou doménou *Fok I* [141] (obrázek 5). Po dimerizaci dojde ke štěpení DNA a indukci mechanismů opravy [137].



Obrázek 5: Editace genomu pomocí nukleasy s motivem zinkového prstu (ZFN). Nukleasová doména *Fok I* rozpoznává 5-7 bp dlouhou sekvenci DNA, kde proběhne štěpení řetězce. *Fok I* vyžaduje ke své aktivitě dimerizaci, vpravo i vlevo od místa štěpení jsou tedy navázány konstrukty zinkových prstů, jejichž každý motiv se váže na trojici bází DNA. Převzato a upraveno z publikace [141].

Používání ZFN pro cílenou úpravu genů bylo již mnohokrát testováno jak *in vitro*, tak *in vivo* u několika druhů zvířat (myši, krysy, králíci, prasata). V roce 2012 byla publikována studie o štěpení intronu 9 lidského *CFTR* genu cílením ZFN do sekvence vzdálené 203 bp od místa mutace $\Delta F508$. Účinnost korekce však byla poměrně nízká (7,8 %), což je přisuzováno právě příliš dlouhé vzdálenosti cílového místa ZFN od mutované oblasti. K dosažení účinné opravy mutace $\Delta F508$ bude tedy potřeba navrhnout takovou nukleasu, která bude schopná štěpit blíže k místu mutace. ZFN mají potenciál pro využití k opravám i dalších mutací, které se nacházejí mezi 10. a 24. exonem *CFTR* genu. Stávající

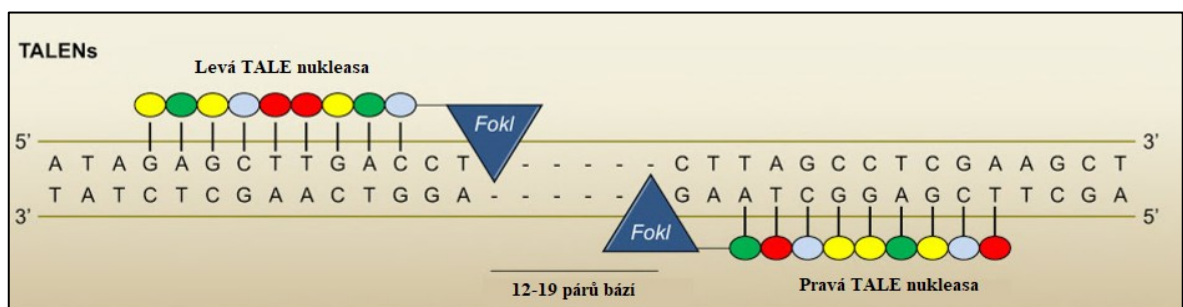
nukleasy by mohly být použity k řízení rekombinace nebo inserce miniaturního genového konstruktů zahrnujícího exony 10-24 z CFTR cDNA do intronu 9. Využití tohoto přístupu by mělo teoreticky umožnit korekci 83 % známých mutací *CFTR* genu [142].

Roku 2015 byly poprvé ZFNs použity v kombinaci s kmenovými buňkami (viz kapitola 3.6.5.). ZFNs byly navrženy a konstruovány tak, aby zajistily korekci konkrétní genetické mutace v předem derivovaných indukovaných pluripotentních kmenových buňkách pacienta (iPSC, z angl. induced pluripotent stem cells). Výsledkem studie bylo obnovení exprese proteinu a funkce CFTR kanálu v epiteliálních buňkách odvozených z iPSC [143].

I tato metoda má však několik nevýhod. Konstrukce těchto specifických nukleas s motivem zinkového prstu je velice obtížná, a navíc také velmi nákladná. Dalším potenciálním problémem je, že specifičnost ZFNs není stoprocentní, což by mohlo vést ke vzniku mimořádných štěpení a s tím souvisejícím poškození DNA [137].

3.6.3.2 "TALEN" technologie

Dalším proteinem schopným vázat DNA je TALE, který je produkován rostlinnými patogenními bakteriemi rodu *Xanthomonas*. Základním stavebním kamenem vazebné domény tohoto proteinu jsou opakující se motivy, z nichž každý obsahuje 33-35 aminokyselin a rozpoznává jediný nukleotid. [144,145]. TALE nukleasy byly vytvořeny analogickým způsobem jako ZFN. Jejich vazebné domény taktéž fúzí se štěpnou doménou endonukleasy *Fok I*. Opět je tedy k nukleasové aktivitě vyžadována dimerizace [145]. I v tomto případě jsou vazebná místa pro TALE oddělena sekvencí, kterou rozpoznává nukleasová doména *Fok I*, sekvence však čítá 12-19 párů bází [141] (obrázek 6).



Obrázek 6: Editace genomu pomocí TALE nukleasy. Nukleasová doména *Fok I* rozpoznává 12-19 bp dlouhou sekvenci DNA, kde proběhne štěpení řetězce. *Fok I* vyžaduje ke své aktivitě dimerizaci, vpravo i vlevo od místa štěpení jsou tedy navázány konstrukty proteinu TALE, jejichž každý motiv se váže na jediný nukleotid, čímž je zajištěna vysoká specifita. Převzato a upraveno z publikace [141].

Podobně jako ZFNs byly i TALENs testovány a vyhodnoceny jako bezpečné a vysoce specifické nástroje pro úpravu lidského genomu [145]. Stejně tak byly využity pro korekci genu u iPSC pacientů s CF, konkrétně s mutací $\Delta F508$ [146].

Ve srovnání s nukleasami s motivy zinkových prstů jsou TALE nukleasy přesnější a mohou štěpit širší spektrum sekvencí DNA [139]. Vysoká štěpící aktivita s nízkou cytotoxicitou a navíc oproti ZFN jejich jednodušší konstrukce jsou vlastnosti, kvůli kterým jsou v posledních letech TALENs upřednostňovaným nástrojem v experimentech genomového inženýrství [145].

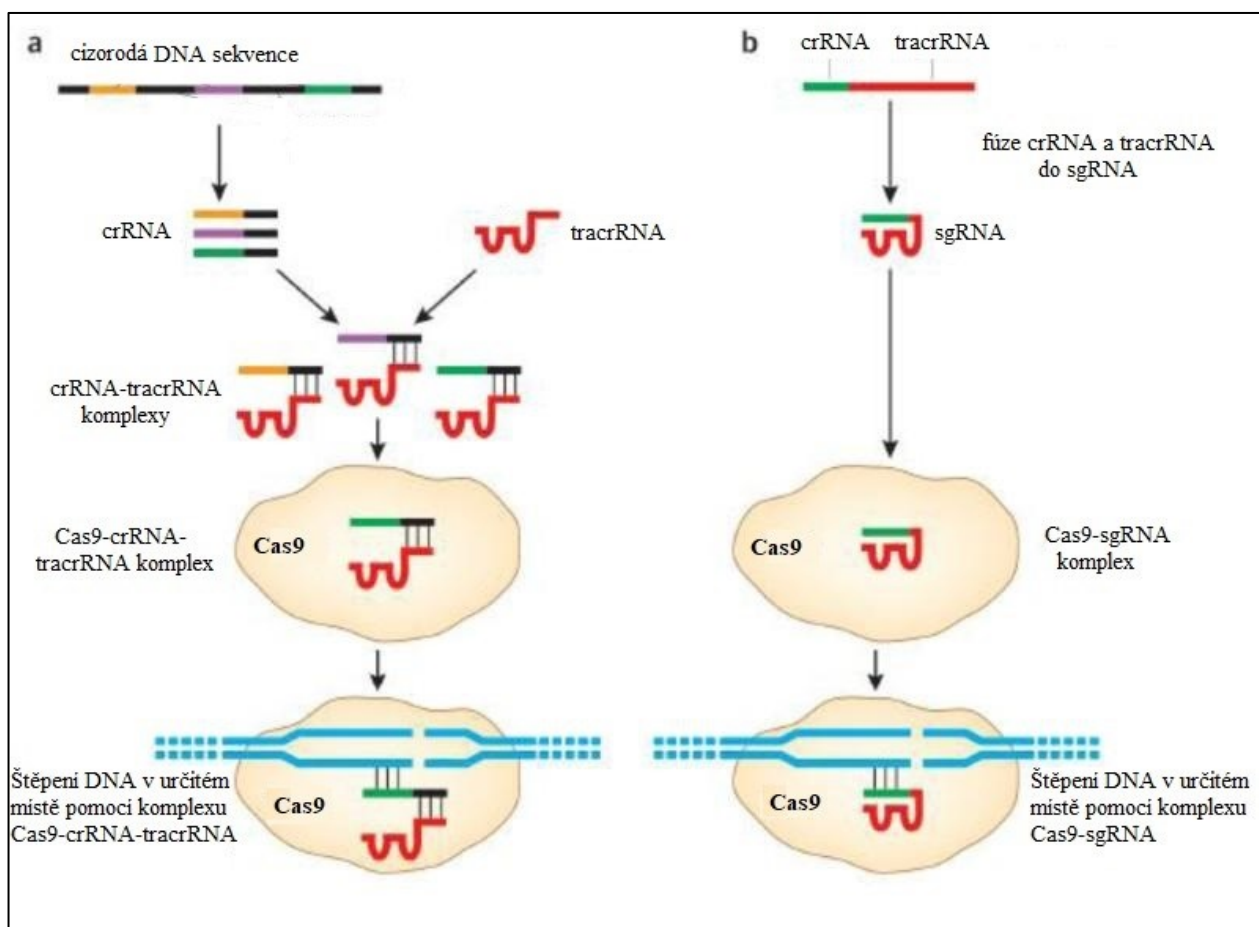
3.6.3.3 "CRISPR/Cas9" technologie

V roce 2012 byl představen přístup založený na systému CRISPR/Cas9, který je součástí imunitní odpovědi mnoha bakterií. Když je bakterie napadena virem nebo plazmidem, její imunitní systém vyvolá přeměnu cizorodé DNA na CRISPR RNA (krátce crRNA). Ta následně asociuje s trans-aktivačním typem RNA, tracrRNA, která navede protein Cas9 fungující jako nukleasa ke specifickému místu na DNA útočnicka, ve kterém je rozštěpena [139] (obrázek 7a, strana 39).

Bylo zjištěno, že navržením nové crRNA a její kombinací s příslušnou tracrRNA může být vytvořena jediná vedoucí RNA (sgRNA, z angl. Single-guide RNA), která by nukleasovou aktivitu nasměrovala do libovolného místa DNA. Studie dále ukázaly, že dodání proteinu s nukleasovou aktivitou Cas9 a odpovídající sgRNA je dostatečné k indukovaní štěpení genu [147,148] (obrázek 7b, strana 39).

Jen několik měsíců po prohlášení CRISPR/Cas9 za potenciálně vhodný nástroj pro editaci genomu byla účinnost technologie experimentálně potvrzena. Studie na malých obratlovcích rychle prokázaly snadnost a účinnost využívání tohoto přístupu [147] a zanedlouho se začal výzkum věnovat editaci genomu pomocí CRISPR/Cas9 v kmenových buňkách. První funkční oprava mutace *CFTR* genu byla úspěšně provedena roku 2013 ve střevních kmenových buňkách [149]. Pokud bude výzkum a vývoj metody CRISPR/Cas9 postupovat rychle i nadále, může být tato strategie klíčová v terapii monogenních onemocnění dýchacího systému [150].

Na rozdíl od ZFNs a TALENs, tento mechanismus nevyžaduje k nukleasové aktivitě dimerizaci proteinu. Celý systém je tedy podstatně jednodušší, z čehož vyplývají také nižší náklady na syntézu a obecně větší dostupnost ve výzkumné komunitě. Přesto je však účinnost CRISPR/Cas9 systému stejná či vyšší než u alternativních ZFN a TALEN [83,137].



Obrázek 7: Editace genomu pomocí systému CRISPR/Cas9. Pokud bakteriální buňka zaznamená průnik cizorodé DNA, spustí obranný mechanismus založený na principu CRISPR/Cas9. Principem je přeměna cizí DNA sekvence na CRISPR RNA (crRNA), která následně fúzuje s trans-aktivační RNA (tracrRNA) za tvorby komplexu. Tento komplex interaguje s proteinem Cas9, který funguje jako nukleasa a štěpí řetězec DNA na specifickém místě (obr. a). Následně bylo zjištěno, že je možné navrhnout novou crRNA a příslušnou tracrRNA, které fúzují do jediné vedoucí RNA (sgRNA). Ta může nasměrovat Cas9 s nukleasovou aktivitou do libovolného místa (obr. b). Převzato a upraveno z publikace [151].

3.6.4 Editace CFTR RNA

Výše uvedené principy editace genomu mají za cíl opravit defekty přímo v mutovaném genu na chromozomu. Zvyšující se znalosti o úloze RNA v posledních 20 letech však umožnily vývoj dalšího terapeutického přístupu – opravy mutované mRNA. Korekce mRNA může být dosaženo několika mechanismy, jako například úpravou sestřihu vyloučením několika exonů nebo zavedením korigovaných oligonukleotidů [130,152].

Na přelomu tisíciletí bylo započato s vývojem technologie nazývané jako tzv. "spliceosomem zprostředkovaný RNA trans-sestřih" (SMaRT, z angl. Spliceosome mediated RNA trans-splicing), který je založen na korekci mutací pomocí posttranskripčních modifikací sekvence mRNA. V kultivovaných lidských buňkách nesoucích mutaci $\Delta F508$ byla opravena mutovaná mRNA a poté došlo k translaci do funkčního CFTR proteinu [152].

První studie prokazující úspěšnou korekci mutované CFTR mRNA pomocí oligonukleotidů byla provedena v roce 2004 a obohatila tak genovou terapii CF o další potenciální možnost léčby [153].

V roce 2013 byla publikována účinná oprava CFTR mRNA poškozené mutací W496X v žabích oocytech pomocí adenosin-deaminasy, což je enzym katalyzující přeměnu adenosinu na inosin, který je při translaci čten jako guanosen. Rekombinantní enzym, který byl pro tuto studii vyvinut, může být selektivně nasměrován k úpravě jediného konkrétního adenosinu. Na základě tohoto principu byl opraven předčasný terminační kodon v mRNA, syntetizován CFTR protein v celé jeho délce a obnovena funkce chloridového transportu. Lokálně řízená nukleotidová deaminace tedy nabízí další potenciální přístup genové terapie CF [154].

V současnosti je v klinických studiích testován oligonukleotid QR-010 zaměřený na korekci mutace $\Delta F508$. QR-010 je chemicky modifikován tak, aby mohl být absorbován cílovými buňkami a aby byla zajištěna jeho stabilita [130].

3.6.5 Terapeutické využití kmenových buněk

Buněčná transplantace plicních kmenových buněk představuje další terapeutický přístup pro celou řadu vrozených monogenních onemocnění plic [143].

Zavedenou a účinnou technikou v terapeutickém využívání kmenových buněk je *ex vivo* transfekce kmenových buněk pocházejících z kostní dřeně (BMSC, z angl. Bone

marrow-derived stem cells) pomocí retrovirových a lentivirových vektorů [92]. V souvislosti s tím, že BMSC jsou schopné diferenciací do epitelálních buněk dýchacích cest [155], bylo uvažováno o možnosti jejich využití k léčbě CF. Následné studie však vyvrátily hypotézu, že by buňky kostní dřeně významně obnovovaly plicní epitel [156]. Po intravenózní aplikaci kostní dřeně myším totiž bylo prokázáno, že pouze 0,8 % tracheálních epitelálních buněk je odvozeno z buněk kostní dřeně [157], a tím pádem došlo pouze k minimální obnově chloridového transportu [86]. Systémové podávání BMSC v současné době nevykazuje velký potenciál pro léčbu CF.

Dalším typem kmenových buněk, které byly zkoumány v souvislosti s terapií plicních onemocnění, jsou mezenchymální kmenové buňky (hMSC, z angl. human mesenchymal stem cells). Ty vylučují protizánětlivé, antimikrobiální a antiapoptické biomolekuly. MSC svými účinky bojují s chronickými infekcemi, které jsou jedním z největších problémů při léčbě CF, zpomalují růst patogenů, mezi které patří nejčastěji *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*, a navíc zvyšují účinnost antibiotik proti těmto bakteriím. Potenciální terapeutický účinek hMSC na plicní buňky byl demonstrován v preklinických studiích na myších modelech *in vivo* [158].

Schopnost vytvářet indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC) z dostupných tkání, jako jsou krevní buňky nebo kůže pacientů, otevřela nové možnosti v terapii lidských onemocnění. Ve spojení se zdokonalujícími se technologiemi pro editaci genomu (viz kapitola 3.6.4) má tento přístup velký potenciál k vyléčení všemožných genetických chorob [159]. Princip spočívá, jak již bylo popsáno, ve využití nukleasy se specifickým místem působení v blízkosti nežádoucí mutace, kde dojde k rozštěpení dvoušroubovice a korekci mutační sekvence v chromozomální DNA pomocí homologně řízené opravy (HDR). Z korigovaných iPSC jsou následně získány plicní kmenové buňky řízenou diferenciací [143].

V posledních několika letech byly k úspěšné korekci *CFTR* genu v lidských iPSC využity jak nukleasy ZFN [143], TALEN [146], tak i CRISPR/Cas9 [159].

3.7 Vyhledky do budoucna

Konečným cílem genové terapie cystické fibrózy je vyvinout takovou léčbu, která zcela zabráni tomuto plicnímu onemocnění. Přechodným cílem je snížit zátěž dosavadní léčby a dále zvyšovat kvalitu a délku života pacientů s CF po celém světě.

V průběhu téměř 30 let od zjištění sekvence *CFTR* genu bylo navrženo mnoho přístupů ke genové terapii CF a několik z nich již vedlo dokonce k potvrzení alespoň částečné korekce transportu chloridových iontů. V současné době je potřeba zvažovat a vyhodnocovat, do jaké míry jsou testované terapeutické přístupy pro pacienty prospěšné a s jakou terapeutickou účinností [109].

Rozsáhlý výzkum genové terapie CF, který vyústil k celkem 27 klinických studií zahrnoval přibližně 600 testovaných pacientů [130]. Valná většina z těchto studií se však pohybovala ve fázích I/IIa, tedy ve fázích testování bezpečnosti terapie, což je nepochybně extrémně důležité, objevily se však názory, že se nad nimi trávilo příliš mnoho času. Pro další zlepšení účinnosti terapeutických přístupů je zapotřebí dalších studií fáze IIb, ve které je prokazována účinnost terapeutika u menšího počtu pacientů, a následně testování u mnohem většího počtu pacientů ve III. fázi, do které se zatím žádný přístup genové terapie nekvalifikoval. Významnou překážkou je navíc financování. Studie CF fáze IIb probíhají po dobu několika měsíců a zahrnují velký počet zúčastněných, jsou proto velmi nákladné. Také produkce či konstrukce veškerých potřebných komponent (virových a nevirových vektorů, specifických nukleas,...) jsou velice nákladnými záležitostmi [90].

Úspěšnost terapie založené na principu vektorového přenosu celého funkčního genu do cílových buněk, je podmíněna několika kritickými faktory. Jak již bylo řečeno, vhodný vektor, který by dopravil daný gen na místo určení, by měl být schopen chránit danou nukleovou kyselinu proti degradaci, zajistit účinnou integraci do cílových buněk i přes veškeré biologické bariéry, a nakonec genetickou informaci uvolnit v místě určení (buď v cytoplasmě, nebo překonat ještě jadernou membránu). Celý tento transfekční proces by měl proběhnout bez indikace imunitní odpovědi hostitele, aby byla zajištěna bezpečnost pacienta a zároveň aby bylo umožněno opakované podávání. Syntéza vektoru by také ideálně neměla být příliš složitá a finančně náročná.

V současnosti největší potenciál v případě virových vektorů představují lentiviry, konkrétně lentivirus F/HN, díky kterému došlo k trvalé expresi *CFTR* genu v plicních buňkách myši. Navíc na rozdíl od jiných typů virových vektorů nedošlo k negativní odpovědi imunitního systému hostitele, což umožnilo opakovanou aplikaci [90]. První fáze

klinických studií testující tento virový vektor je naplánována na druhou polovinu roku 2017 [110] a jsou do ní vkládány velké naděje na úspěšnou expresi *CFTR* genu také v lidských buňkách.

Naopak neviróvé vektory se obecně jeví jako málo účinné, přesto je kationtovému liposomu GL67 věnována pozornost již téměř 20 let. Výsledky klinické studie IIb fáze sice neprokázaly přítomnost vektorové *CFTR* mRNA v cytoplazmě, nicméně došlo ke stabilizaci plicních funkcí u pacientů trpících CF [129]. Tento vliv genové terapie pomocí neviróvých přenašečů na plicní funkce byl dostatečnou motivací pro zahájení další studie ke zlepšení účinnosti nosiče pGM169/GL67A. Pokud budou tyto studie úspěšné, předpokládá se postoupení klinického testování do III. fáze.

Relativně neprozkoumanou strategií genové terapie CF je oprava *CFTR* proteinu vnesením mRNA do cílových buněk. Tento přístup vyniká oproti DNA zprostředkovanému přenosu mnoha výhodami a zároveň již zmíněné nevýhody jsou řešitelné různými modifikacemi molekuly mRNA. Uvádí se, že přenos mRNA pomocí lentivirového vektoru by mohl být v budoucnu jedním z klíčových prvků genové terapie, pokud bude věnována větší pozornost vývoji a testování tohoto směru.

Také editace genetické informace, ať už na úrovni DNA či RNA, představuje v současnosti jeden z nejslibnějších přístupů k vyléčení CF. Schopnost editačních technik štěpit řetězec DNA téměř v libovolném místě vytváří ideální nástroj pro opravu prakticky všech mutací genu. V posledních letech jsou nejvíce studovány korekce *CFTR* genu pomocí ZFN, TALEN a CRISPR/Cas9 technik v indukovaných pluripotentních kmenových buňkách pacientů. Největší potenciál je do budoucna vkládán do poslední jmenované metody, jejíž pomocí byla provedena první úspěšná oprava mutace *CFTR* genu ve střevních kmenových buňkách [149], která se stala obrovskou motivací pro další studie. Tato strategie by mohla být klíčovým prostředkem k vyléčení nejen cystické fibrózy, ale i dalších monogenních onemocnění dýchacího systému.

Vyvinutí účinného terapeutického přístupu založeného na genové terapii by definitivně vyléčilo cystickou fibrózu. Navíc by byl takový způsob terapie nadějí pro pacienty v méně rozvinutých zemích, kde by mohla být přeskočena náročná a nákladná symptomatická léčba, která v současnosti stále tvoří základní kámen terapie CF [90]. Všeobecně je známo, že pacienti z rozvojových zemí trpí velmi špatným prospíváním a sníženou funkcí plic. V důsledku nedostatečné symptomatické léčby je v těchto zemích stále velmi nízká hranice dožití. Pacienti se často nedožijí dospělosti [5].

4 ZÁVĚR

Cystická fibróza je jakožto monogenní porucha vhodným cílem pro léčbu pomocí genové terapie, neboť představuje možnost vyléčení tohoto onemocnění bez ohledu na typ mutace, kterým pacient trpí. Ačkoli zatím nebyl vyvinut terapeutický prostředek, který by nemoc definitivně vyléčil, existuje mnoho strategií, které představují slibný základ pro úspěšnou léčbu pomocí genové terapie. S prohlubujícími se znalostmi o plicní morfologii a patogenezi, o možnostech modifikace nukleových kyselin nesoucích genetickou informaci a mnoha dalšími poznatky z oblasti genového inženýrství se výrazně zlepšily a nadále zlepšují principy zkoumané v preklinických a klinických studiích. Výsledky dosavadních studií poskytly dostatečnou motivaci k dalšímu vývoji a zlepšování testovaných postupů a předpokládá se, že v budoucnu bude možné příčiny cystické fibrózy zásahem do lidského genomu odstranit.

5 SEZNAM LITERATURY

1. Fajac, I., Wainwright, C.E. (2017) New treatments targeting the basic defects in cystic fibrosis. *La Presse Médicale* **46**, 165–75.
2. Amaral, M.D. (2015) Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J. Intern. Med.* **277**, 155–66.
3. Andersen, D.H. (1938) Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathologic study. *Am. J. Dis. Child* **56**, 344–99.
4. Vávrová, V. (2006) *Cystická fibróza* (Grada Publishing a.s., Praha).
5. Kerem, E. (2017) Cystic fibrosis: Priorities and progress for future therapies. *Paediatric Respiratory Reviews* .
6. Riordan, Rommens, J., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066–73.
7. Chin, M., Aaron, S.D., Bell, S.C. (2017) The treatment of the pulmonary and extrapulmonary manifestations of cystic fibrosis. *Presse Med* **46**, 139–64.
8. Navarro, S. (2016) Historical compilation of cystic fibrosis. *Gastroenterol Hepatol* **39**, 36–42.
9. Bush, A. (2006) *Cystic Fibrosis in the 21st Century* (Karger Medical and Scientific Publishers, Basel).
10. Křenková, P., Piskáčková, T., Holubová, A., Balaščaková, M., Krulišová, V., Čamajová, J., Turnovec, M., Libík, M., Norambuena, P., Štambergová, A., Dvořáková, L., Skalická, V., Bartošová, J., Kučerová, T., Fila, L., Zemková, D., Vávrová, V., Koudová, M., Macek, M., Krebsová, A., Macek, M. (2013) Distribution of CFTR mutations in the Czech population: positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. *J. Cyst. Fibros.* **12**, 532–37.
11. Griesenbach, U., Pytel, K.M., Alton, E.W.F.W. (2015) Cystic Fibrosis Gene Therapy in the UK and Elsewhere. *Human Gene Therapy* **26**, 266–75.
12. Quinton, P.M. (2008) Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet* **372**, 415–17.
13. Mishra, A., Greaves, R., Massie, J. (2005) The Relevance of Sweat Testing for the Diagnosis of Cystic Fibrosis in the Genomic Era. *Clin Biochem Rev.* **26**, 135–53.
14. Stern, R.C., Boat, T.F., Doershuk, C.F. (1982) Obstructive azoospermia as a diagnostic criterion for the cystic fibrosis syndrome. *Lancet* **1**, 1401–4.
15. Flume, P.A., O’Sullivan, B.P., Robinson, K.A., Goss, C.H., Mogayzel, P.J., Willey-Courand, D.B., Bujan, J., Finder, J., Lester, M., Quittell, L., Rosenblatt, R., Vender, R.L., Hazle, L., Sabadosa, K., Marshall, B., Cystic Fibrosis Foundation, Pulmonary Therapies Committee (2007) Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 957–69.

16. Spielberg, D.R., Clancy, J.P. (2016) Cystic Fibrosis and Its Management Through Established and Emerging Therapies. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **17**, 155–75.
17. Puchelle, E., Zahm, J.-M., Tournier, J.-M., Couraux, C. (2006) Airway Epithelial Repair, Regeneration, and Remodeling after Injury in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *ATS Journals* **3**, 726–33.
18. Matsui, H., Grubb, B.R., Tarran, R., Randell, S.H., Gatzky, J.T., Davis, C.W., Boucher, R.C. (1998) Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* **95**, 1005–15.
19. Button, B., Cai, L.-H., Ehre, C., Kesimer, M., Hill, D.B., Sheehan, J.K., Boucher, R.C., Rubinstein, M. (2012) A Periciliary Brush Promotes the Lung Health by Separating the Mucus Layer from Airway Epithelia. *Science* **337**, 937–41.
20. Berdiev, B.K., Qadri, Y.J., Benos, D.J. (2009) Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol Biosyst* **5**, 123–27.
21. Adler, F.R., Liou, T.G. (2016) The Dynamics of Disease Progression in Cystic Fibrosis. *PLoS ONE* **11**.
22. Konstan, M.W., Berger, M. (1997) Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr. Pulmonol.* **24**, 137–42.
23. Ratjen, F., Paul, K., van Koningsbruggen, S., Breitenstein, S., Rietschel, E., Nikolaizik, W. (2005) DNA concentrations in BAL fluid of cystic fibrosis patients with early lung disease: influence of treatment with dornase alpha. *Pediatr. Pulmonol.* **39**, 1–4.
24. Wilschanski, M., Novak, I. (2013) The Cystic Fibrosis of Exocrine Pancreas. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**.
25. Sabharwal, S. (2016) Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **12**, 43–47.
26. "Malabsorption Clinical Presentation" [online]. Dostupné na <http://emedicine.medscape.com/article/180785-clinical>. [zobrazeno 21-12-2016].
27. Narkewicz, M.R. (2016) Cystic Fibrosis Liver Disease and Ursodeoxycholic Acid: One Small Step Forward, Miles to Go. *The Journal of Pediatrics* **177**, 17–18.
28. Jebbink, M.C., Heijerman, H.G., Masclee, A.A., Lamers, C.B. (1992) Gallbladder disease in cystic fibrosis. *Neth J Med* **41**, 123–26.
29. Jones, G.H., Walshaw, M.J. (2015) Potential impact on fertility of new systemic therapies for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* **16**, 25–27.
30. Grigoriadis, C., Tympa, A., Theodoraki, K. (2015) Cystic fibrosis and pregnancy: counseling, obstetrical management and perinatal outcome. *Invest Clin* **56**, 66–73.
31. Xu, J., Lin, L., Yong, M., Dong, X., Yu, T., Hu, L. (2016) Adenovirus-mediated overexpression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator enhances invasiveness and motility of serous ovarian cancer cells. *Mol Med Rep* **13**, 265–72.
32. Xie, C., Jiang, X.H., Zhang, J.T., Sun, T.T., Dong, J.D., Sanders, A.J., Diao, R.Y., Wang, Y., Fok, K.L., Tsang, L.L., Yu, M.K., Zhang, X.H., Chung, Y.W., Ye, L., Zhao, M.Y., Guo, J.H., Xiao, Z.J., Lan, H.Y., Ng, C.F., Lau, K.M., Cai, Z.M., Jiang, W.G., Chan, H.C. (2013) CFTR suppresses tumor progression through miR-193b targeting urokinase plasminogen activator (uPA) in prostate cancer. *Oncogene* **32**, 2282–91.

33. Borthwick, L.A., Kerbirou, M., Taylor, C.J., Cozza, G., Lascu, I., Postel, E.H., Cassidy, D., Trouvé, P., Mehta, A., Robson, L., Muimo, R. (2016) Role of Interaction and Nucleoside Diphosphate Kinase B in Regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function by cAMP-Dependent Protein Kinase A. *PLoS ONE* **11**.
34. Riordan, J.R. (2008) CFTR Function and Prospects for Therapy. *Annual Review of Biochemistry* **77**, 701–26.
35. Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**, 1156–66.
36. Gadsby, D.C., Vergani, P., László Csanády (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **440**, 477–83.
37. Welsh, M.J., Smith, A.E. (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* **73**, 1251–54.
38. Chin, S., Hung, M., Bear, C.E. (2017) Current insights into the role of PKA phosphorylation in CFTR channel activity and the pharmacological rescue of cystic fibrosis disease-causing mutants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **74**, 57–66.
39. Sheppard, D.N., Welsh, M.J. (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**, 23–45.
40. Li, C., Naren, A.P. (2005) Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacology & Therapeutics* **108**, 208–23.
41. Hwang, T.-C., Sheppard, D.N. (2009) Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation: CFTR channel gating. *The Journal of Physiology* **587**, 2151–61.
42. Linsdell, P. (2005) Location of a Common Inhibitor Binding Site in the Cytoplasmic Vestibule of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Chloride Channel Pore. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 8945–50.
43. Gong, X., Linsdell, P. (2004) Maximization of the rate of chloride conduction in the CFTR channel pore by ion-ion interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **426**, 78–82.
44. Linsdell, P. (2006) Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel: Cl⁻ permeation in the CFTR Cl⁻ channel. *Experimental Physiology* **91**, 123–29.
45. Gout, T. (2012) Role of ATP binding and hydrolysis in the gating of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annals of Thoracic Medicine* **7**, 115.
46. Hryciw, D.H., Guggino, W.B. (2000) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the outwardly rectifying chloride channel: a relationship between two chloride channels expressed in epithelial cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **27**, 892–95.
47. Meng, X., Clews, J., Kargas, V., Wang, X., Ford, R.C. (2017) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and its stability. *Cellular and Molecular Life Sciences* **74**, 23–38.
48. Carson, M.R., Travis, S.M., Welsh, M.J. (1995) The Two Nucleotide-binding Domains of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Have

- Distinct Functions in Controlling Channel Activity. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 1711–17.
49. Callebaut, I., Hoffmann, B., Lehn, P., Mornon, J.-P. (2017) Molecular modelling and molecular dynamics of CFTR. *Cellular and Molecular Life Sciences* **74**, 3–22.
 50. Gadsby, D.C., Nairn, A.C. (1999) Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol. Rev.* **79**, 77–107.
 51. Sorum, B., Czégé, D., Csanády, L. (2015) Timing of CFTR Pore Opening and Structure of Its Transition State. *Cell* **163**, 724–33.
 52. Wei, L., Vankeerberghen, A., Cuppens, H., Eggermont, J., Cassiman, J.J., Droogmans, G., Nilius, B. (1999) Interaction between calcium-activated chloride channels and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch.* **438**, 635–41.
 53. Choi, J.Y., Muallem, D., Kiselyov, K., Lee, M.G., Thomas, P.J., Muallem, S. (2001) Aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature* **410**, 94–97.
 54. Edlund, A., Pedersen, M.G., Lindqvist, A., Wierup, N., Flodström-Tullberg, M., Eliasson, L. (2017) CFTR is involved in the regulation of glucagon secretion in human and rodent alpha cells. *Scientific Reports* **7**.
 55. Alves, M.G., Sá, R., Jesus, T.T., Sousa, M., Oliveira, P.F. (2015) CFTR Regulation of Aquaporin-Mediated Water Transport: A Target in Male Fertility. *Curr Drug Targets* **16**, 993–1006.
 56. Jesus, T.T., Bernardino, R.L., Martins, A.D., Sá, R., Sousa, M., Alves, M.G., Oliveira, P.F. (2014) Aquaporin-9 is expressed in rat Sertoli cells and interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *IUBMB Life* **66**, 639–44.
 57. Carter, S.C., McKone, E.F. (2016) Pharmacogenetics of cystic fibrosis treatment. *Pharmacogenomics* **17**, 1453–63.
 58. Maurya, N., Awasthi, S., Dixit, P. (2012) Association of CFTR gene mutation with bronchial asthma. *Indian J. Med. Res.* **135**, 469–78.
 59. Dixit, P., Awasthi, S., Maurya, N., Agarwal, S., Srinivasan, M. (2015) CFTR Gene Mutations and Asthma in Indian Children: A Case–Control Study. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **30**, 35–42.
 60. "Cystic Fibrosis Mutation Database: Statistics" [online]. Dostupné na <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>. [zobrazeno 25-06-2017].
 61. "Overview of common CFTR mutations" [online]. Dostupné na <http://www.cftr.info/about-cf/cftr-mutations/cftr-epidemiology/>. [zobrazeno 25-06-2017].
 62. Marson, F.A.L., Bertuzzo, C.S., Ribeiro, J.D. (2016) Classification of CFTR mutation classes. *The Lancet Respiratory Medicine* **4**, 37–38.
 63. De Boeck, K., Amaral, M.D. (2016) Progress in therapies for cystic fibrosis. *The Lancet Respiratory Medicine* **4**, 662–74.
 64. Wilschanski, M. (2012) Class 1 CF Mutations. *Frontiers in Pharmacology* **3**.
 65. Vankeerberghen, A., Cuppens, H., Cassiman, J.-J. (2002) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *Journal of Cystic Fibrosis* **1**, 13–29.

66. Will, K., Dörk, T., Stuhmann, M., von der Hardt, H., Ellemunter, H., Tümmler, B., Schmidtke, J. (1995) Transcript analysis of CFTR nonsense mutations in lymphocytes and nasal epithelial cells from cystic fibrosis patients. *Hum. Mutat.* **5**, 210–20.
67. Jilling, T., Kirk, K.L. (1997) The biogenesis, traffic, and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Int. Rev. Cytol.* **172**, 193–241.
68. Logan, J., Hiestand, D., Daram, P., Huang, Z., Muccio, D.D., Hartman, J., Haley, B., Cook, W.J., Sorscher, E.J. (1994) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations that disrupt nucleotide binding. *Journal of Clinical Investigation* **94**, 228–36.
69. Accurso, F.J., Rowe, S.M., Clancy, J.P., Boyle, M.P., Dunitz, J.M., Durie, P.R., Sagel, S.D., Hornick, D.B., Konstan, M.W., Donaldson, S.H., Moss, R.B., Pilewski, J.M., Rubenstein, R.C., Uluer, A.Z., Aitken, M.L., Freedman, S.D., Rose, L.M., Mayer-Hamblett, N., Dong, Q., Zha, J., Stone, A.J., Olson, E.R., Ordoñez, C.L., Campbell, P.W., Ashlock, M.A., Ramsey, B.W. (2010) Effect of VX-770 in Persons with Cystic Fibrosis and the G551D- *CFTR* Mutation. *New England Journal of Medicine* **363**, 1991–2003.
70. Ferec, C., Cutting, G.R. (2012) Assessing the Disease-Liability of Mutations in CFTR. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2**, 9480.
71. Koch, C., Cuppens, H., Rainisio, M., Madessani, U., Harms, H., Hodson, M., Mastella, G., Navarro, J., Strandvik, B., McKenzie, S., Investigators of the ERCF (2001) European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr. Pulmonol.* **31**, 1–12.
72. Cebotaru, L., Rapino, D., Cebotaru, V., Guggino, W.B. (2014) Correcting the Cystic Fibrosis Disease Mutant, A455E CFTR. *PLoS ONE* **9**.
73. Rowntree, R.K., Harris, A. (2003) The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Annals of Human Genetics* **67**, 471–85.
74. Stanke, F., Tümmler, B. (2016) Classification of CFTR mutation classes. *The Lancet Respiratory Medicine* **4**, 36.
75. Cohen-Cymerknoh, M., Shoseyov, D., Kerem, E. (2011) Managing cystic fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 1463–71.
76. Fowler, T., Walker, D., Davies, S.C. (2014) The risk/benefit of predicting a post-antibiotic era: is the alarm working? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1323**, 1–10.
77. Krylov, V., Shaburova, O., Pleteneva, E., Bourkaltseva, M., Krylov, S., Kaplan, A., Chesnokova, E., Kulakov, L., Magill, D., Polygach, O. (2016) Modular Approach to Select Bacteriophages Targeting *Pseudomonas aeruginosa* for Their Application to Children Suffering With Cystic Fibrosis. *Front Microbiol* **7**, 1631.
78. Robinson, M., Regnis, J.A., Bailey, D.L., King, M., Bautovich, G.J., Bye, P.T. (1996) Effect of hypertonic saline, amiloride, and cough on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 1503–9.
79. Robinson, M., Daviskas, E., Eberl, S., Baker, J., Chan, H.K., Anderson, S.D., Bye, P.T. (1999) The effect of inhaled mannitol on bronchial mucus clearance in cystic fibrosis patients: a pilot study. *Eur. Respir. J.* **14**, 678–85.

80. Knowles, M.R., Clarke, L.L., Boucher, R.C. (1991) Activation by Extracellular Nucleotides of Chloride Secretion in the Airway Epithelia of Patients with Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine* **325**, 533–38.
81. Quon, B.S., Rowe, S.M. (2016) New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis. *BMJ*, 859.
82. Martini, S.V., Rocco, P.R.M., Morales, M.M. (2011) Adeno-associated virus for cystic fibrosis gene therapy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **44**, 1097–1104.
83. Villate-Beitia, I., Zarate, J., Puras, G., Pedraz, J.L. (2017) Gene delivery to the lungs: pulmonary gene therapy for cystic fibrosis. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **43**, 1071–81.
84. Armstrong, D.K., Cunningham, S., Davies, J.C., Alton, E.W.F.W. (2014) Gene therapy in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* **99**, 465–68.
85. Brunetti-Pierri, N., Ng, P. (2008) Progress and prospects: gene therapy for genetic diseases with helper-dependent adenoviral vectors. *Gene Therapy* **15**, 553–60.
86. Griesenbach, U., Alton, E.W.F.W. (2012) Progress in gene and cell therapy for cystic fibrosis lung disease. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 642–62.
87. Gill, D.R., Hyde, S.C. (2014) Delivery of genes into the CF airway. *Thorax* **69**, 962–64.
88. Kerem, E. (2004) Pharmacologic therapy for stop mutations: how much CFTR activity is enough? *Curr Opin Pulm Med* **10**, 547–52.
89. Thomas, C.E., Ehrhardt, A., Kay, M.A. (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics* **4**, 346–58.
90. Paul-Smith, M.C., Bell, R.V., Alton, W.E., Alton, E.W.F.W., Griesenbach, U. (2016) Gene therapy for cystic fibrosis: recent progress and current aims. *Expert Opinion on Orphan Drugs* **4**, 649–58.
91. Mueller, C., Flotte, T.R. (2008) Gene therapy for cystic fibrosis. *Clin Rev Allergy Immunol* **35**, 164–78.
92. Griesenbach, U., Alton, E.W.F.W. (2009) Gene transfer to the lung: Lessons learned from more than 2 decades of CF gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 128–39.
93. Griesenbach, U., Alton, E.W.F.W. (2013) Moving forward: cystic fibrosis gene therapy. *Human Molecular Genetics* **22**, 52–58.
94. Croyle, M.A., Chirmule, N., Zhang, Y., Wilson, J.M. (2001) „Stealth" adenoviruses blunt cell-mediated and humoral immune responses against the virus and allow for significant gene expression upon readministration in the lung. *J. Virol.* **75**, 4792–4801.
95. Morró, M., Teichenne, J., Jimenez, V., Kratzer, R., Marletta, S., Maggioni, L., Mallol, C., Ruberte, J., Kochanek, S., Bosch, F., Ayuso, E. (2014) Pancreatic Transduction by Helper-Dependent Adenoviral Vectors via Intraductal Delivery. *Human Gene Therapy* **25**, 824–36.
96. Cots, D., Bosch, A., Chillón, M. (2013) Helper dependent adenovirus vectors: progress and future prospects. *Curr Gene Ther* **13**, 370–81.
97. Brunetti-Pierri, N., Ng, P. (2017) Gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: lessons from studies in large animal models. *Virus Genes*, 1–8.

98. Robbins, P.D., Ghivizzani, S.C. (1998) Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol. Ther.* **80**, 35–47.
99. Kotin, R.M., Linden, R.M., Berns, K.I. (1992) Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J.* **11**, 5071–78.
100. Schnepf, B.C., Jensen, R.L., Chen, C.-L., Johnson, P.R., Clark, K.R. (2005) Characterization of Adeno-Associated Virus Genomes Isolated from Human Tissues. *Journal of Virology* **79**, 14793–803.
101. Nance, M.E., Duan, D. (2015) Perspective on Adeno-Associated Virus Capsid Modification for Duchenne Muscular Dystrophy Gene Therapy. *Human Gene Therapy* **26**, 786–800.
102. Sanlioglu, S., Monick, M.M., Luleci, G., Hunninghake, G.W., Engelhardt, J.F. (2001) Rate limiting steps of AAV transduction and implications for human gene therapy. *Curr Gene Ther* **1**, 137–47.
103. Chamberlain, K., Riyad, J.M., Weber, T. (2016) Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids. *Human Gene Therapy Methods* **27**, 1–12.
104. Guggino, W.B., Cebotaru, L. (2017) Adeno-Associated Virus (AAV) gene therapy for cystic fibrosis: current barriers and recent developments. *Expert Opin Biol Ther* , 1–9.
105. Martini, F., Corallini, A., Balatti, V., Sabbioni, S., Pancaldi, C., Tognon, M. (2007) Simian virus 40 in humans. *Infectious Agents and Cancer* **2**, 13.
106. Prickett, M., Jain, M. (2013) Gene therapy in cystic fibrosis. *Transl Res* **161**, 255–64.
107. Johnson, L.G. (2001) Retroviral approaches to gene therapy of cystic fibrosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **953**, 43–52.
108. Sumner-Jones, S.G., Gill, D.R., Hyde, S.C. (2010) Gene therapy for cystic fibrosis lung disease in *Gene Therapy for Autoimmune and Inflammatory Diseases*. (Springer Basel, Basel), s 47–64.
109. Davies, J., Burney, Alton, E. (2012) Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. *The Application of Clinical Genetics* **5**, 29-36.
110. Alton, E.W.F.W., Beekman, J.M., Boyd, A.C., Brand, J., Carlon, M.S., Connolly, M.M., Chan, M., Conlon, S., Davidson, H.E., Davies, J.C., Davies, L.A., Dekkers, J.F., Doherty, A., Gea-Sorli, S., Gill, D.R., Griesenbach, U., Hasegawa, M., Higgins, T.E., Hironaka, T., Hyndman, L., McLachlan, G., Inoue, M., Hyde, S.C., Innes, J.A., Maher, T.M., Moran, C., Meng, C., Paul-Smith, M.C., Pringle, I.A., Pytel, K.M., et al. (2017) Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis. *Thorax* **72**, 137–47.
111. Enders, G. (1996) Paramyxoviruses in *Medical Microbiology*. (University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston).
112. Somia, N., Verma, I.M. (2000) Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* **1**, 91–99.
113. Davis, M.E. (2002) Non-viral gene delivery systems. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 128–31.
114. Pezzoli, D., Chiesa, R., De Nardo, L., Candiani, G. (2012) We still have a long way to go to effectively deliver genes! *J Appl Biomater Funct Mater* **10**, 82–91.

115. Ziady, A.G., Davis, P.B., Konstan, M.W. (2003) Non-viral gene transfer therapy for cystic fibrosis. *Expert Opinion on Biological Therapy* **3**, 449–58.
116. Flotte, T.R., Laube, B.L. (2001) Gene Therapy in Cystic Fibrosis. *Chest* **120**, 124–31.
117. Ciani, L., Ristori, S., Salvati, A., Calamai, L., Martini, G. (2004) DOTAP/DOPE and DC-Chol/DOPE lipoplexes for gene delivery: zeta potential measurements and electron spin resonance spectra. *Biochim. Biophys. Acta* **1664**, 70–79.
118. Caplen, N.J., Alton, E.W., Middleton, P.G., Dorin, J.R., Stevenson, B.J., Gao, X., Durham, S.R., Jeffery, P.K., Hodson, M.E., Coutelle, C. (1995) Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat. Med.* **1**, 39–46.
119. Goddard, C.A., Ratcliff, R., Anderson, J.R., Glenn, E., Brown, S., Gill, D.R., Hyde, S.C., MacVinish, L.J., Huang, L., Higgins, C.F., Cuthbert, A.W., Evans, M.J., Colledge, W.H. (1997) A second dose of a CFTR cDNA-liposome complex is as effective as the first dose in restoring cAMP-dependent chloride secretion to null CF mice trachea. *Gene Ther.* **4**, 1231–36.
120. Alton, E., Stern, M., Farley, R., Jaffe, A., Chadwick, S., Phillips, J., Davies, J., Smith, S., Browning, J., Davies, M., Hodson, M., Durham, S., Li, D., Jeffery, P., Scallan, M., Balfour, R., Eastman, S., Cheng, S., Smith, A., Meeker, D., Geddes, D. (1999) Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *The Lancet* **353**, 947–54.
121. Lee, E.R., Marshall, J., Siegel, C.S., Jiang, C., Yew, N.S., Nichols, M.R., Nietupski, J.B., Ziegler, R.J., Lane, M.B., Wang, K.X., Wan, N.C., Scheule, R.K., Harris, D.J., Smith, A.E., Cheng, S.H. (1996) Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1701–17.
122. Hyde, S.C., Pringle, I.A., Abdullah, S., Lawton, A.E., Davies, L.A., Varathalingam, A., Nunez-Alonso, G., Green, A.-M., Bazzani, R.P., Sumner-Jones, S.G., Chan, M., Li, H., Yew, N.S., Cheng, S.H., Boyd, A.C., Davies, J.C., Griesenbach, U., Porteous, D.J., Sheppard, D.N., Munkonge, F.M., Alton, E.W.F.W., Gill, D.R. (2008) CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat. Biotechnol.* **26**, 549–51.
123. Alton, E.W.F.W., Boyd, A.C., Cheng, S.H., Davies, J.C., Davies, L.A., Dayan, A., Gill, D.R., Griesenbach, U., Higgins, T., Hyde, S.C., Innes, J.A., McLachlan, G., Porteous, D., Pringle, I., Scheule, R.K., Sumner-Jones, S. (2014) Toxicology study assessing efficacy and safety of repeated administration of lipid/DNA complexes to mouse lung. *Gene Ther.* **21**, 89–95.
124. Villate-Beitia, I., Puras, G., Zarate, J., Agirre, M., Ojeda, E., Pedraz, J.L. (2015) First Insights into Non-invasive Administration Routes for Non-viral Gene Therapy in *Gene Therapy - Principles and Challenges* (InTech), s 145-177.
125. Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A.M., Langer, R. (2005) Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *The Journal of Gene Medicine* **7**, 657–63.
126. Konstan, M.W., Davis, P.B., Wagener, J.S., Hilliard, K.A., Stern, R.C., Milgram, L.J.H., Kowalczyk, T.H., Hyatt, S.L., Fink, T.L., Gedeon, C.R., Oette, S.M., Payne, J.M., Muhammad, O., Ziady, A.G., Moen, R.C., Cooper, M.J. (2004) Compacted DNA nanoparticles administered to the nasal mucosa of cystic fibrosis subjects are

- safe and demonstrate partial to complete cystic fibrosis transmembrane regulator reconstitution. *Hum. Gene Ther.* **15**, 1255–69.
127. Suk, J.S., Kim, A.J., Trehan, K., Schneider, C.S., Cebotaru, L., Woodward, O.M., Boylan, N.J., Boyle, M.P., Lai, S.K., Guggino, W.B., Hanes, J. (2014) Lung gene therapy with highly compacted DNA nanoparticles that overcome the mucus barrier. *Journal of Controlled Release* **178**, 8–17.
 128. McLachlan, G., Davidson, H., Holder, E., Davies, L.A., Pringle, I.A., Sumner-Jones, S.G., Baker, A., Tennant, P., Gordon, C., Vrettou, C., Blundell, R., Hyndman, L., Stevenson, B., Wilson, A., Doherty, A., Shaw, D.J., Coles, R.L., Painter, H., Cheng, S.H., Scheule, R.K., Davies, J.C., Innes, J.A., Hyde, S.C., Griesenbach, U., Alton, E.W.F.W., Boyd, A.C., Porteous, D.J., Gill, D.R., Collie, D.D.S. (2011) Pre-clinical evaluation of three non-viral gene transfer agents for cystic fibrosis after aerosol delivery to the ovine lung. *Gene Ther.* **18**, 996–1005.
 129. Alton, E.W.F.W., Armstrong, D.K., Ashby, D., Bayfield, K.J., Bilton, D., Bloomfield, E.V., Boyd, A.C., Brand, J., Buchan, R., Calcedo, R., Carvelli, P., Chan, M., Cheng, S.H., Collie, D.D.S., Cunningham, S., Davidson, H.E., Davies, G., Davies, J.C., Davies, L.A., Dewar, M.H., Doherty, A., Donovan, J., Dwyer, N.S., Elgmati, H.I., Featherstone, R.F., Gavino, J., Gea-Sorli, S., Geddes, D.M., Gibson, J.S.R., Gill, D.R., et al. (2015) Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med* **3**, 684–91.
 130. Alton, E.W.F.W., Boyd, A.C., Davies, J.C., Gill, D.R., Griesenbach, U., Harrison, P.T., Henig, N., Higgins, T., Hyde, S.C., Innes, J.A., Korman, M.S.D. (2016) Genetic medicines for CF: Hype versus reality: Genetic Medicines for CF. *Pediatric Pulmonology* **51**, 5–17.
 131. Bangel-Ruland, N., Tomczak, K., Fernández Fernández, E., Leier, G., Leciejewski, B., Rudolph, C., Rosenecker, J., Weber, W.-M. (2013) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mRNA delivery: a novel alternative for cystic fibrosis gene therapy: CFTR-mRNA delivery for the treatment of CF. *The Journal of Gene Medicine* **15**, 414–26.
 132. Yamamoto, A., Kormann, M., Rosenecker, J., Rudolph, C. (2009) Current prospects for mRNA gene delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **71**, 484–89.
 133. Youn, H., Chung, J.-K. (2015) Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* **15**, 1337–48.
 134. Elango, N., Elango, S., Shivshankar, P., Katz, M.S. (2005) Optimized transfection of mRNA transcribed from a d(A/T)₁₀₀ tail-containing vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 958–66.
 135. Ren, T., Song, Y.K., Zhang, G., Liu, D. (2000) Structural basis of DOTMA for its high intravenous transfection activity in mouse. *Gene Ther.* **7**, 764–68.
 136. Dhooghe, B., Haaf, J.B., Noel, S., Leal, T. (2016) Strategies in early clinical development for the treatment of basic defects of cystic fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* **25**, 423–36.
 137. Kormann, M.S.D. (2015) In vivo Gene Correction of Cystic Fibrosis in *Cystic Fibrosis in the Light of New Research* (InTech), 357-380.

138. Perez-Pinera, P., Ousterout, D.G., Gersbach, C.A. (2012) Advances in targeted genome editing. *Current Opinion in Chemical Biology* **16**, 268–77.
139. Segal, D.J. (2013) Bacteria herald a new era of gene editing. *Elife* **2**.
140. Kim, Y.G., Cha, J., Chandrasegaran, S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 1156–60.
141. Laurence, J. (2015) *Translating gene therapy to the clinic: techniques and experimental approaches* (Elsevier, Boston).
142. Lee, C.M., Flynn, R., Hollywood, J.A., Scallan, M.F., Harrison, P.T. (2012) Correction of the $\Delta F508$ Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Zinc-Finger Nuclease Homology-Directed Repair. *BioResearch Open Access* **1**, 99–108.
143. Crane, A.M., Kramer, P., Bui, J.H., Chung, W.J., Li, X.S., Gonzalez-Garay, M.L., Hawkins, F., Liao, W., Mora, D., Choi, S., Wang, J., Sun, H.C., Paschon, D.E., Guschin, D.Y., Gregory, P.D., Kotton, D.N., Holmes, M.C., Sorscher, E.J., Davis, B.R. (2015) Targeted Correction and Restored Function of the CFTR Gene in Cystic Fibrosis Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* **4**, 569–77.
144. Sun, N., Zhao, H. (2013) Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): A highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnology and Bioengineering* **110**, 1811–21.
145. Mussolino, C., Alzubi, J., Fine, E.J., Morbitzer, R., Cradick, T.J., Lahaye, T., Bao, G., Cathomen, T. (2014) TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity. *Nucleic Acids Research* **42**, 6762–73.
146. Camarasa, M.V., Gálvez, V.M. (2016) Robust method for TALEN-edited correction of pF508del in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* **7**.
147. Mojica, F.J.M., Montoliu, L. (2016) On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends in Microbiology* **24**, 811–20.
148. Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., Doudna, J. (2013) RNA-programmed genome editing in human cells. *ELife* **2**.
149. Schwank, G., Koo, B.-K., Sasselli, V., Dekkers, J.F., Heo, I., Demircan, T., Sasaki, N., Boymans, S., Cuppen, E., van der Ent, C.K., Nieuwenhuis, E.E.S., Beekman, J.M., Clevers, H. (2013) Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. *Cell Stem Cell* **13**, 653–58.
150. Alapati, D., Morrissey, E.E. (2017) Gene Editing and Genetic Lung Disease. Basic Research Meets Therapeutic Application. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **56**, 283–90.
151. Sander, J.D., Joung, J.K. (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* **32**, 347–55.
152. Mansfield, S.G., Kole, J., Puttaraju, M., Yang, C.C., Garcia-Blanco, M.A., Cohn, J.A., Mitchell, L.G. (2000) Repair of CFTR mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Gene Ther.* **7**, 1885–95.
153. Zamecnik, P.C., Raychowdhury, M.K., Tabatadze, D.R., Cantiello, H.F. (2004) Reversal of cystic fibrosis phenotype in a cultured 508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cell line by oligonucleotide insertion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 8150–55.

154. Montiel-Gonzalez, M.F., Vallecillo-Viejo, I., Yudowski, G.A., Rosenthal, J.J.C. (2013) Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 18285–90.
155. Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., Sharkis, S.J. (2001) Multi-Organ, Multi-Lineage Engraftment by a Single Bone Marrow-Derived Stem Cell. *Cell* **105**, 369–77.
156. Kotton, D.N., Fabian, A.J., Mulligan, R.C. (2005) Failure of Bone Marrow to Reconstitute Lung Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **33**, 328–34.
157. MacPherson, H. (2005) Bone marrow-derived SP cells can contribute to the respiratory tract of mice in vivo. *Journal of Cell Science* **118**, 2441–50.
158. Sutton, M.T., Fletcher, D., Ghosh, S.K., Weinberg, A., van Heeckeren, R., Kaur, S., Sadeghi, Z., Hijaz, A., Reese, J., Lazarus, H.M., Lennon, D.P., Caplan, A.I., Bonfield, T.L. (2016) Antimicrobial Properties of Mesenchymal Stem Cells: Therapeutic Potential for Cystic Fibrosis Infection, and Treatment. *Stem Cells International* **2016**, 1–12.
159. Firth, A.L., Menon, T., Parker, G.S., Qualls, S.J., Lewis, B.M., Ke, E., Dargitz, C.T., Wright, R., Khanna, A., Gage, F.H., Verma, I.M. (2015) Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Reports* **12**, 1385–90.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádné vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka