A microscopic view of red blood cells, showing their characteristic biconcave disc shape and reddish color. The cells are in focus, with some appearing more prominent than others. The background is a dark, slightly blurred red, suggesting a dense population of cells.

Molekulární hematologie nemaligních onemocnění

**Júlia Starková, Ester Mejstříková,
Karolina Škvárová Kramarzová**

**julia.starkova@lfmotol.cuni.cz
ester.mejstrikova@lfmotol.cuni.cz
karolina.skvarova@lfmotol.cuni.cz**

Geneticky podmíněná hematologická onemocnění

Molekulární patogenze

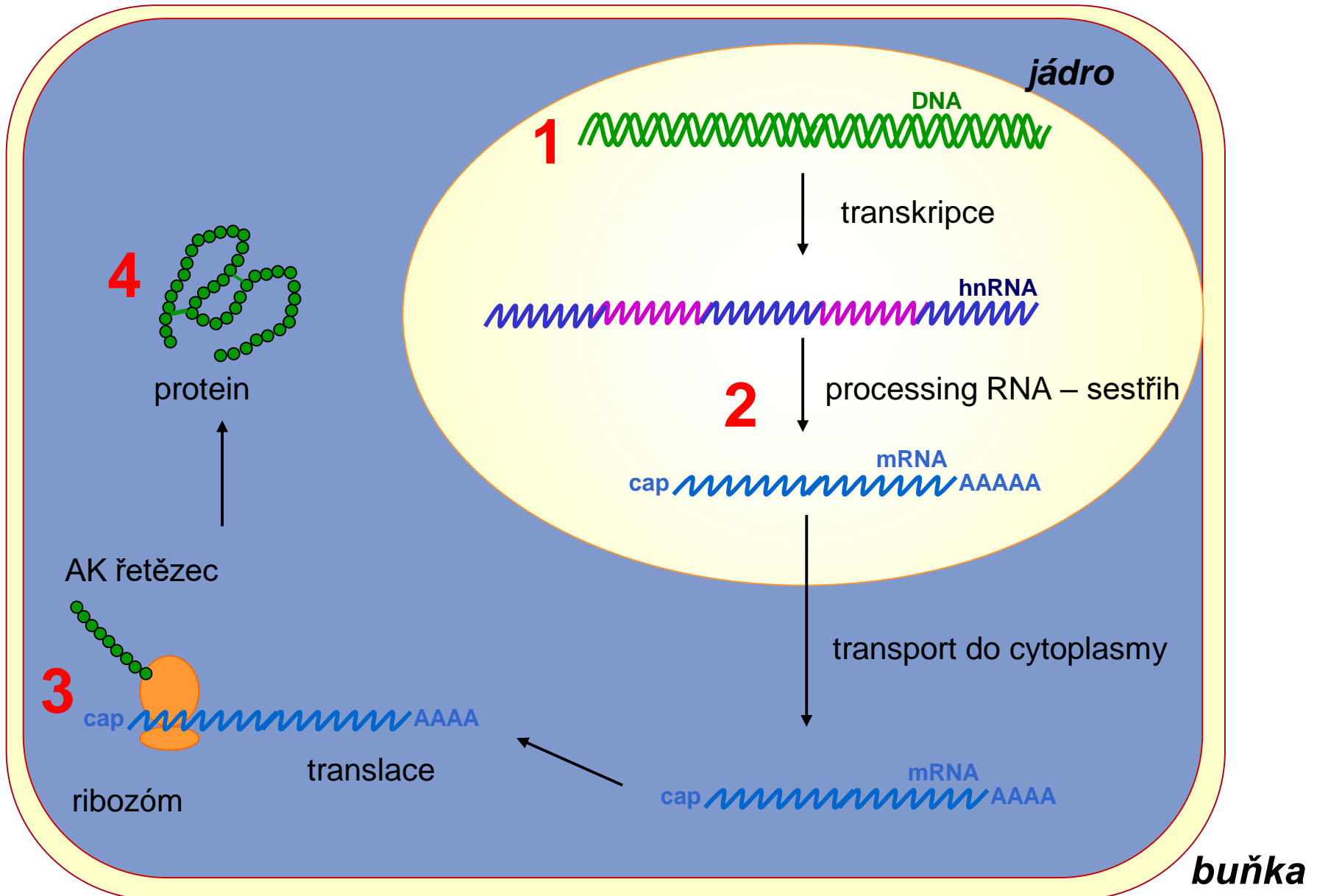
Cílená terapie

Genová terapie

Molekulární diagnostika

Molekulární patogenze

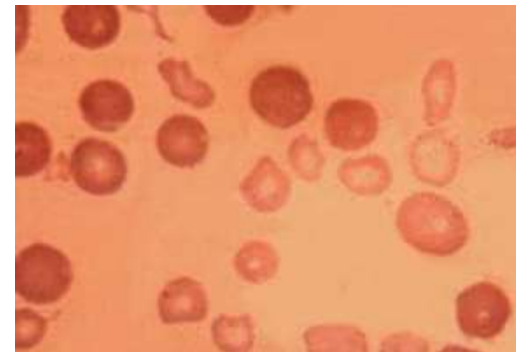
Schéma genové exprese



1. Thalasemie

Thalasemie

- chyba v produkci globinového řetězce
- 270 miliónů nosičů celosvětově
- nejčastější monogenní onemocnění
- nejvyšší frekvence mutantních alel v oblastech s výskytem malárie
- měnící se epidemiologie vzhledem k migraci (onemocnění se více a více týká oblastí i bez malárie, např. USA)



Podle řetězce:

α Thalasemie
(Africa, Asia)

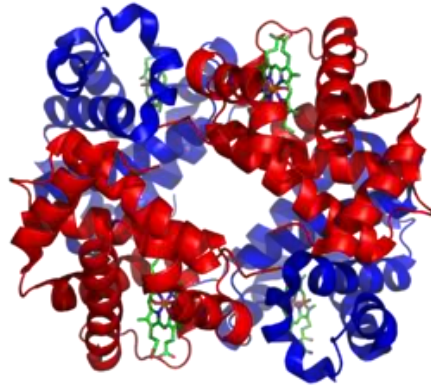
β Thalasemie
(Africa, Europe)

Z funkčního hlediska:

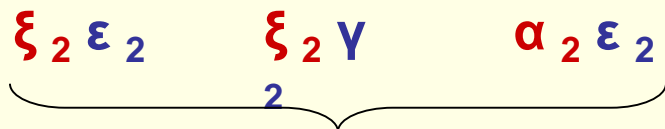
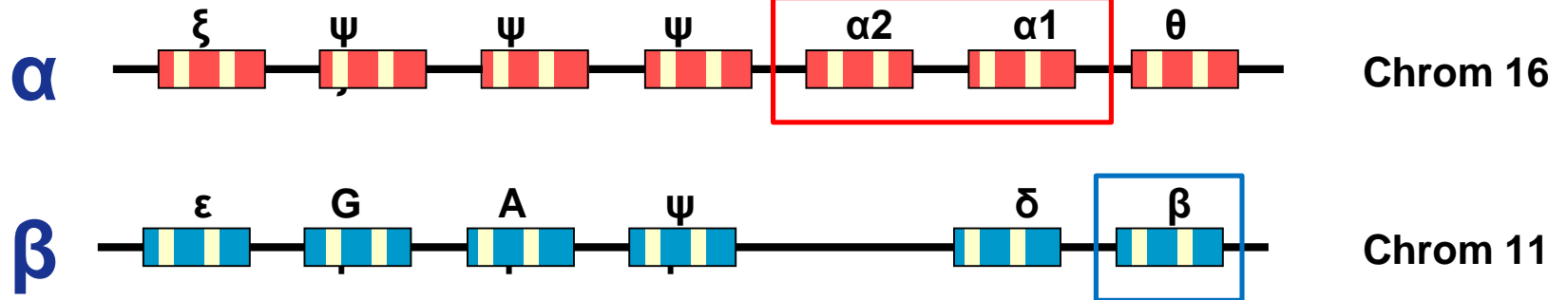
0 úplná ztráta řetězce

+ částečná ztráta řetězce

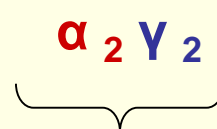
Hemoglobin



struktura genů hemoglobinové rodiny



Embryo



Fetus



Dospělý

Genetická příčina onemocnění

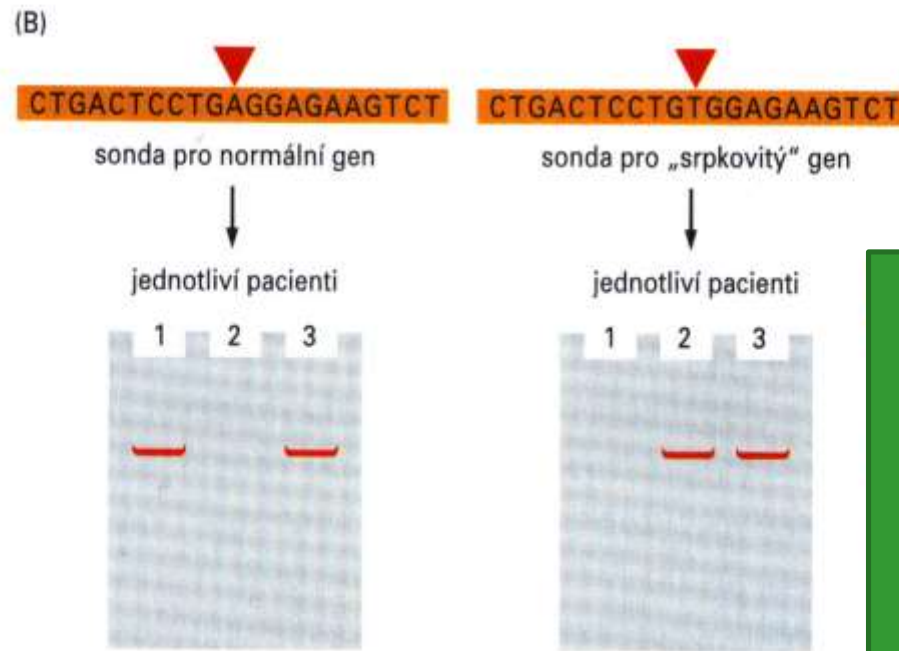
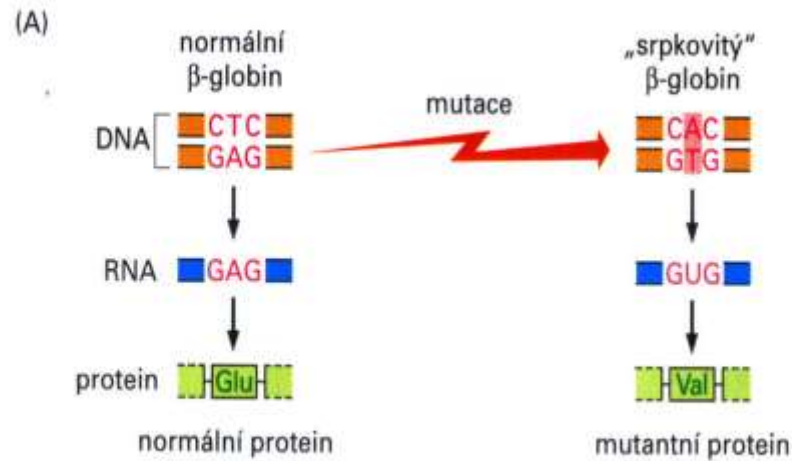
- více než 1000 mutací postihující α a/nebo β řetězec
- **α thalasemie:**
 - 2 geny = 4 alely
 - **1 mutovaná alela** → žádný projev
 - **2 mutované alely** → heterozygot, minimum projevů, hraniční anémie
 - **3 mutované alely** → vede k tzv. hemoglobin H syndromu podle excessu β_4 řetězce, mikrocytická hypochromická anémie, hypersplenomegálie
 - delece všech **4 alel** vede k hydrops fetalis
- **β thalasemie:**
 - popsáno asi 200 převážně bodových mutací
 - 1 gen/2 alely
 - **1 mutovaná alela** – β thalasemia minor
 - **2 mutované alely** – β thalasemia major
 - specifický typ mutace - β thalasemia intermedia

Manifestace onemocnění

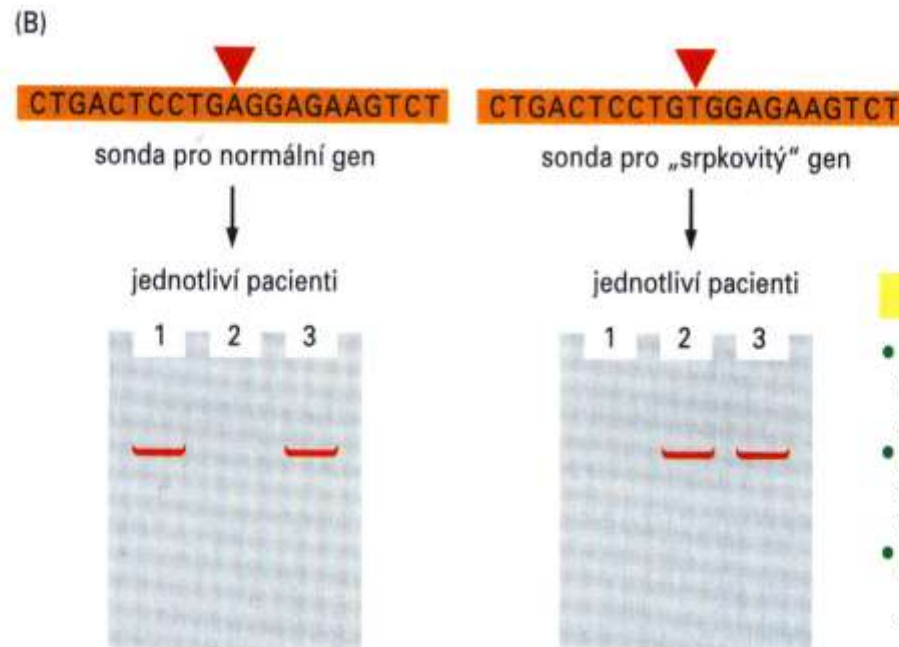
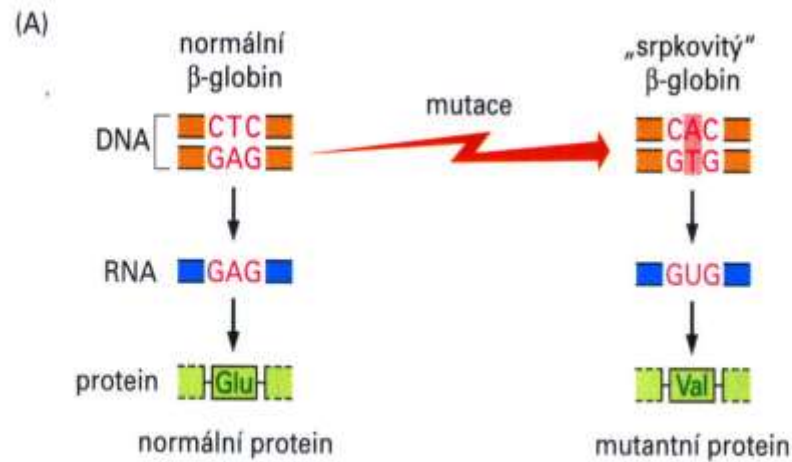
- **nevyrovnaná exprese α a β řetězce, inefektivní erythropoéza, hemolýza, různě těžká anémie, velká fenotypová variabilita, deformita lebky a kostí, splenomegalie, postižení myokardu**
- v řadě případů nutné opakované transfúze, které vedou k přetížení železem a k nutnosti léčby
- mortalita způsobená u těžkých forem sepsí a poškozením myokardu
- i pacienti bez transfuze mohou vyvinout hemochromatózu na podkladě zvýšené absorpce železa ze střeva

2. Srpkovitá anémie (SCD)

Genetická příčina onemocnění



Genetická příčina onemocnění



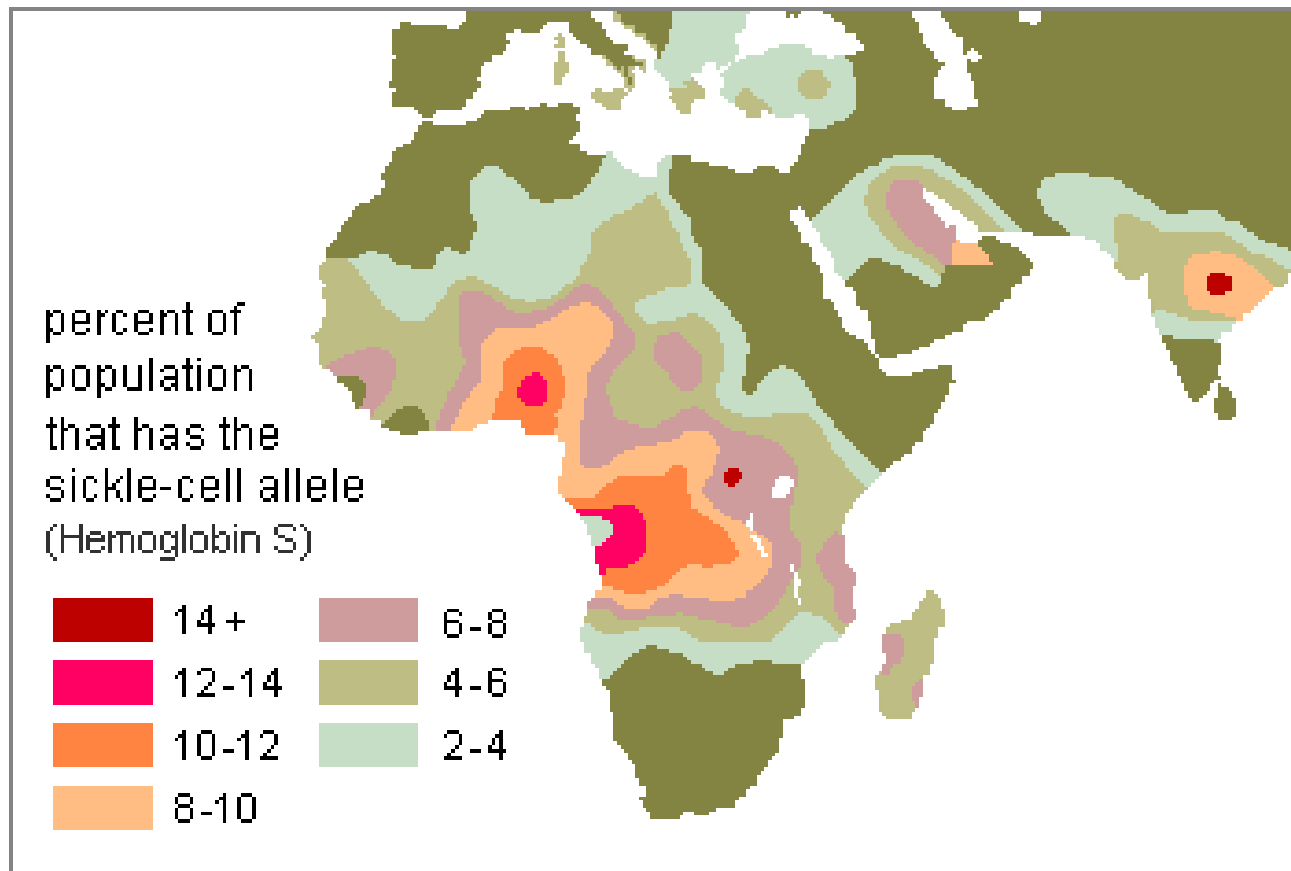
ZÁVĚR

- pacient 1 má 2 normální geny pro β -globin
- pacient 2 má 2 „srpkovité“ geny pro β -globin
- pacient 3 má 1 normální a 1 „srpkovitý“ gen

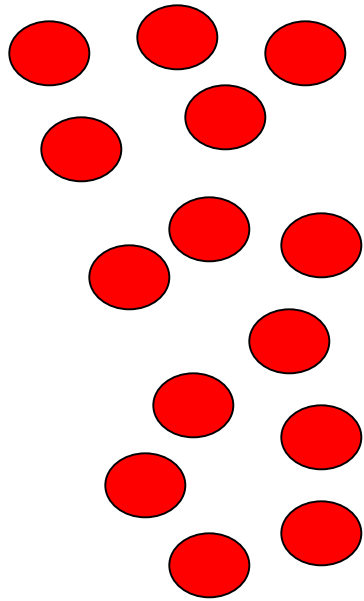
Výskyt SCD (Sickle Cell Disease)

- genová frekvence** – 0,14 západní ekvatoriální Afrika
– 0,1 Saudská Arábie a část Indie
– 0,04 Jižní a Severní Amerika

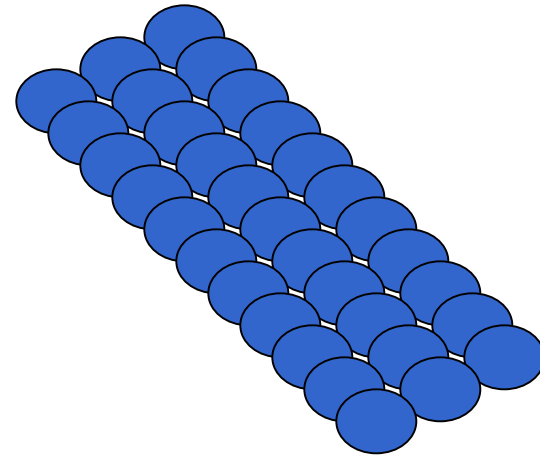
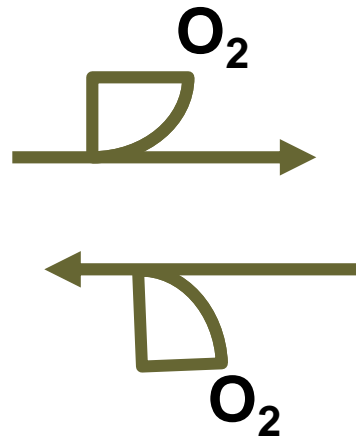
(USA 8% heterozygotů, 1 z 500 obyvatelů trpí onemocněním)



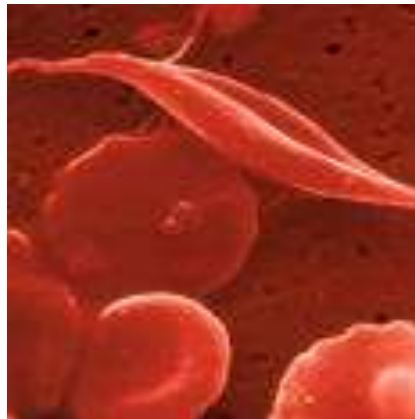
$\beta 6$ globin: Glu \rightarrow Val



HbS oxy



HbS deoxy polymer

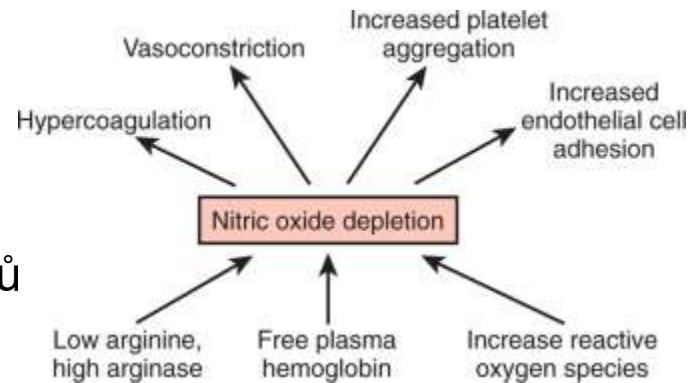


Patofyziologie SCD

- vytvoření polymerů HbS u deoxygenních erytrocytů

→ **formování srpkovitých buněk**

- zvýšená adheze erytrocytů k endotelu (valin)
- abnormální kationtová homeostáza → buněčná dehydratace
- vasokonstrikce (via NO – úloha volného hemoglobinu, uvolnění arginázy z porušených erytrocytů vedoucí k nedostatku substrátu argininu pro syntézu NO, endothelin-1)
→ prodloužení mikrovaskulárního tranzitu erytrocytů
snížená životnost erytrocytů 8 – 21 dní



Cílená Léčba

Léčba

Table I. HbF-inducing drugs in childhood SCD.

Drug	Mechanism of action
Hydroxycarbamide (hydroxyurea)	Ribonucleotide inhibitor HbF induction mainly due to cytostatic effects
Decitabine	Reduces DNA methylation of <i>HBB</i> via inhibition of DNA methyltransferases (DNMT) May also increase HbF via its cytostatic effects
Butyrate	Inhibits histone deacetylase (HDAC) Increases efficiency of <i>HBB</i> mRNA translation
Experimental agents	
Erythropoietin	Increases F cells
Thalidomide, lenalidomide, and pomalidomide	Regulate <i>HBB</i> and <i>HBB</i> transcription; synergise with hydroxycarbamide to increase F cells
Mithramycin and angelicin	Increase <i>HBB</i> mRNA in cultured human erythroid cells

BJH 2009, Trompeter et al.

Klíčový cíl – zvýšení syntézy HbF

- transfúzní program
- hydroxyurea
- léčba bolesti
- blokátory iontových kanálů
- anti-adhezivní a protizánětlivá léčba (anti-P-selectin, inhibitor NFκB)
- inhalace NO
- transplantace kostní dřeně (zejména pokud je identický sourozenec)
- genová terapie

Fetální hemoglobin

- Inhibitor polymerizace deoxyhemoglobinu S
- Hladina HbF predikuje klinickou závažnost u pacientů s SCD
- Inverzní korelace mezi koncentrací HbF a frekvence bolestivých krizí, acute chest syndrome a úmrtí
- Cílem terapie je dosáhnout zvýšení HbF v každé buňce SCD, která bude schopna nabourat polymerizaci HbS

Cílená léčba I.

- **Hydroxyurea – jediná látka schválena FDA pro léčbu SCD**

VÝHODY

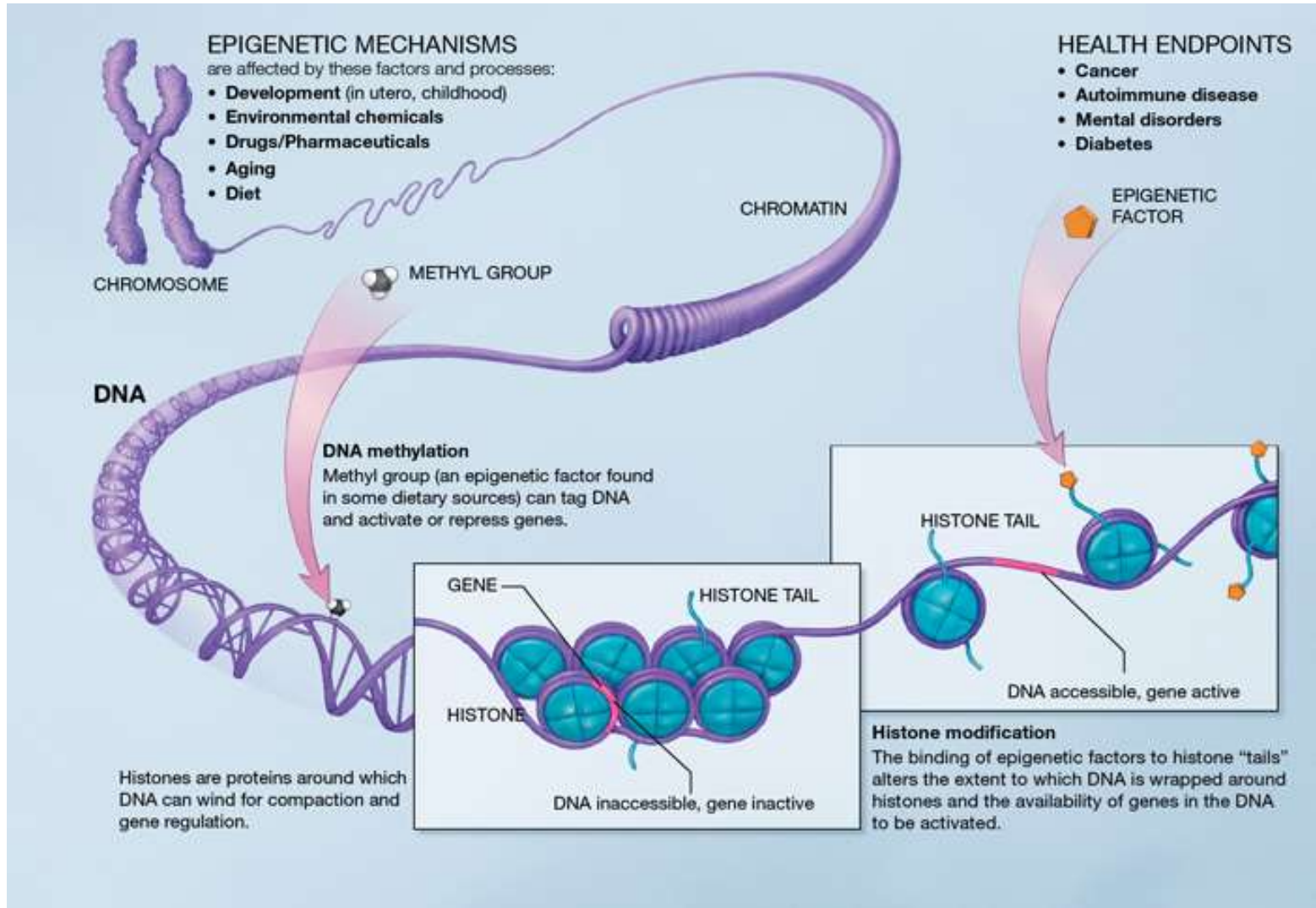
- cytotoxická látka; zvyšuje koncentraci HbF
- zvýšení množství HbF a F buněk (brání i polymeraci HbS)
- inhibice kationtové deplece, adhezivity s endotelem
- FDA (USA): léčba zlepšuje výskyt komplikací je „cost effective“

NEVÝHODY

- existují non-respondeři, karcinogenní a leukemogenní efekt při dlouhodobé léčbě
- potenciální teratogen

Cílená léčba II.

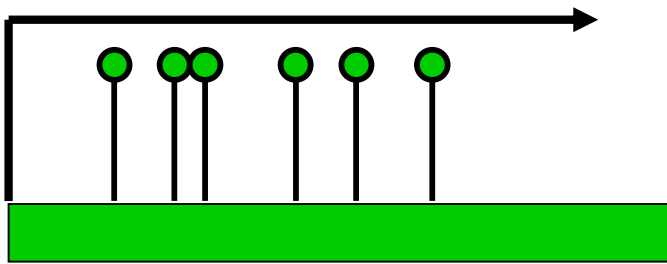
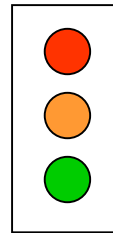
- **Chromatin remodeling**



Chromatin remodeling

	Mechanisms	Epigenetic proteins/RNAs	Effects
Epigenetics	Histone modifications: Acetyl, Methyl	Writers: EZH2, SETD2, ATM, MLL1 Readers: BRD1, CHD2, PHF6, ASXL1 Erasers: HDAC, UTX, JMJD3, BAP1	<p>Writers: Ac, M</p> <p>Readers: C1, C2</p> <p>Erasers: Ac, M</p>
	DNA methylation: Methyl	Writers: DNMT3a, DNMT3b, DNMT1 Erasers: TET1, TET2, TET3	<p>Transcription ON: Exon 1, Exon 2</p> <p>Transcription OFF: Exon 1, Exon 2</p>
	Non-coding RNA	miRNAs lncRNAs	Splicing Editing mRNA stability Translation initiation

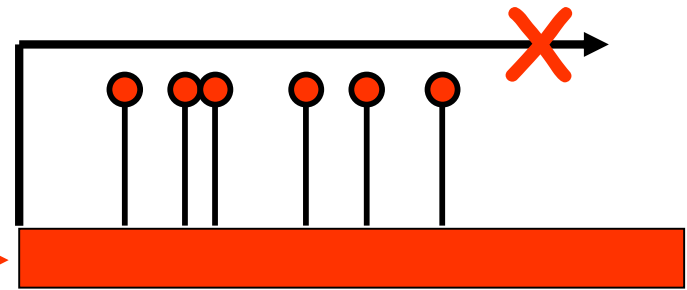
DNA metylace



transkripčně aktivní chromatin

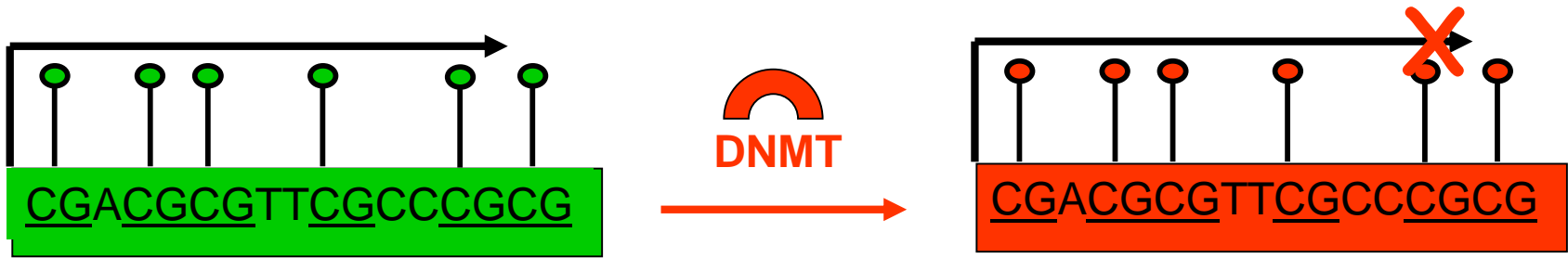
cytosine

DNMT



transkripčně neaktivní chromatin

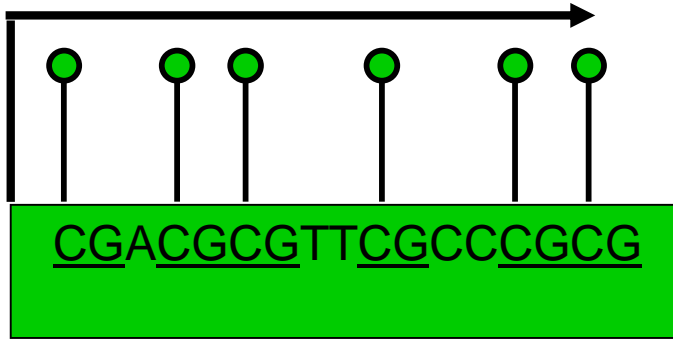
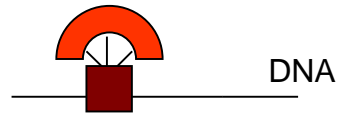
5-methyl cytosin



promotorová oblast γ -globinu po narození

promotorová oblast γ -globinu v dospělosti

■
hypometylační látky



promotorová oblast γ -globinu u dospělého po podání hypometylačních látek

Hypometylační látky

5-azacytidine

inkorporace do DNA a RNA, kovalentní vazba s DNA metyltransferasou a její následná degradace enzymu – výsledkem je re-exprese γ -globínu

(DNMT; udržuje metylační pattern během replikace)

účinek: u pavíánů 40-70 násobné zvýšení exprese γ -globinového genu

5-aza-2'-deoxycytidine(decitabine)

inkorporace do DNA, účinnější než 5-azacytidin

hypometylace γ -globinu; zvýšení acetylovaného H3 a H4 asociovaného s γ -globinovým promotorem

První studie na pacientech

8 pacientů léčených **intravenózně decitabinem** 2 týdny
(5 pacientů nezvyšovalo hladiny HbF, 2 pacienti neodpovídali na léčbu HU a 1 nebyl léčený HU)

3,5% → 13,5% HbF

21% → 55% F buňky

sledování toxicity 63 týdnů – bez toxických příznaků,
výskyt neutropenie

8 pacientů léčených **subkutánně decitabinem** 6 týdnů
(pacienti neodpovídali na léčbu HU)

6,5% → 20,4% HbF

38% → 71% F buňky

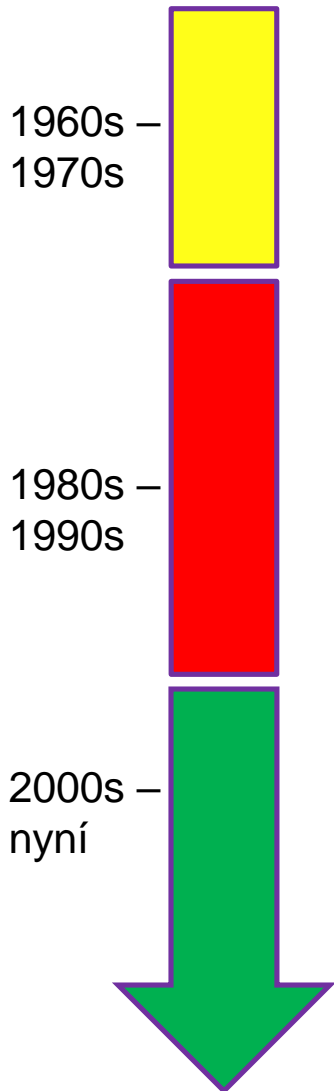
Table I. Clinical status before and during decitabine therapy.

	Significant clinical events and overall clinical status	
	In the 12 months before decitabine administration	During decitabine administration
Patient 1: 22 years old, female, HbSS	<p>>16 ER visits, >290 hospital in-patient days</p> <p>Life-threatening hyperhaemolysis, life-threatening hepatic crisis, severe pain on long-acting opiates and regular IV opiates</p> <p>Transfusion x7</p> <p>ECOG PS 3*</p>	<p><u>(12 months follow-up)</u></p> <p>7 ER visits, <30 hospital in-patient days</p> <p>No life-threatening crises, mostly out-patient pain-management without need for long-acting opiates</p> <p>No transfusions</p> <p>ECOG PS 1-2</p>
Patient 2: 36 years old, female, HbSS	<p>>11 ER visits, >150 hospital in-patient days in 180-d period prior to decitabine initiation</p> <p>CHF, severe pain requiring intravenous narcotics</p> <p>Transfusion x4</p> <p>ECOG PS 3*</p>	<p><u>(8 months follow-up)</u></p> <p>3 ER visits, >60 d at home without ER visits, longest period without admission in preceding 20 months</p> <p>No CHF, out-patient pain management with oral meds</p> <p>No transfusions</p> <p>ECOG PS 1-2</p>
Patient 3: 63 years old, female, HbSS	<p>89-d hospital admission for intractable and life-threatening CHF</p> <p>Transfusion x4</p> <p>ECOG PS 4*</p>	<p><u>(7 months follow-up)</u></p> <p>Resolution of CHF and discharge to home</p> <p>Transfusion x4 (triggered by attempts to discontinue decitabine or darbopoietin and a gastrointestinal bleed) (no transfusion required in latest 8-week period)</p> <p>ECOG PS 2</p>
Patient 4: 22 years old, female, HbSS	<p>>10 ER visits, 111 hospital in-patient days</p> <p>Life-threatening CHF and severe pain</p> <p>Transfusion x5</p> <p>ECOG PS 3-4*</p>	<p><u>(4 months follow-up)</u></p> <p>>60 d at home without ER visits, longest period without admission in preceding 16 months</p> <p>Stabilization and improvement in CHF and pain allowing discharge to home</p> <p>Transfusion x6 (no transfusion required in latest 8-week period)</p> <p>ECOG PS 2</p>

Genová terapie

Proč a kdy...

„replacing a faulty gene with a functional copy can cure a disease“



- **1966** – první zmínka o **genové terapii** pro dědičné choroby
- **1966** – vložení genů do virů
- **nezdary...**
- **genotoxicita**
- **skepticizmus a znepokojení**
- **renesance genové terapie**
- zavedení bezpečnější strategie pro vnesení genu do buněk
- klinické studie → schválené léčebné produkty
- **GENOVÁ EDITACE!!!**

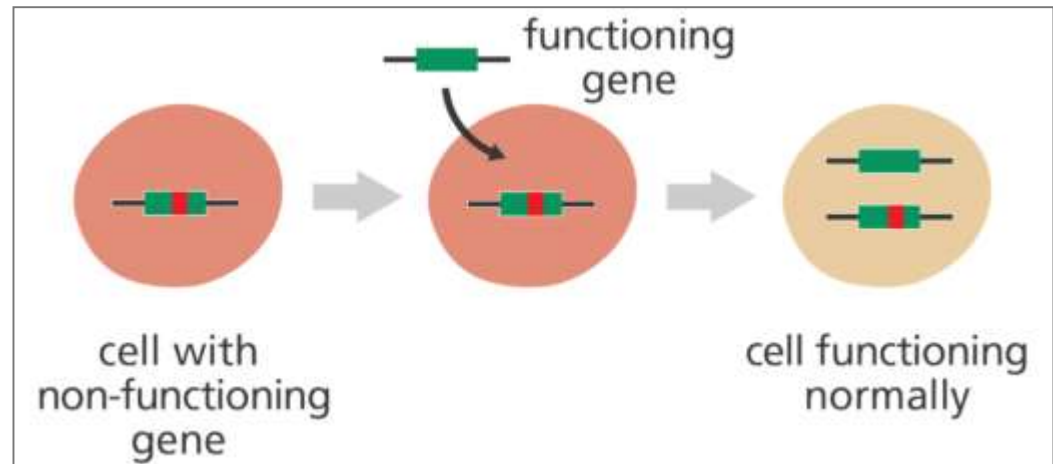
Definice...

- **Gene addition**

≈ dodání genu

- prototyp genové terapie

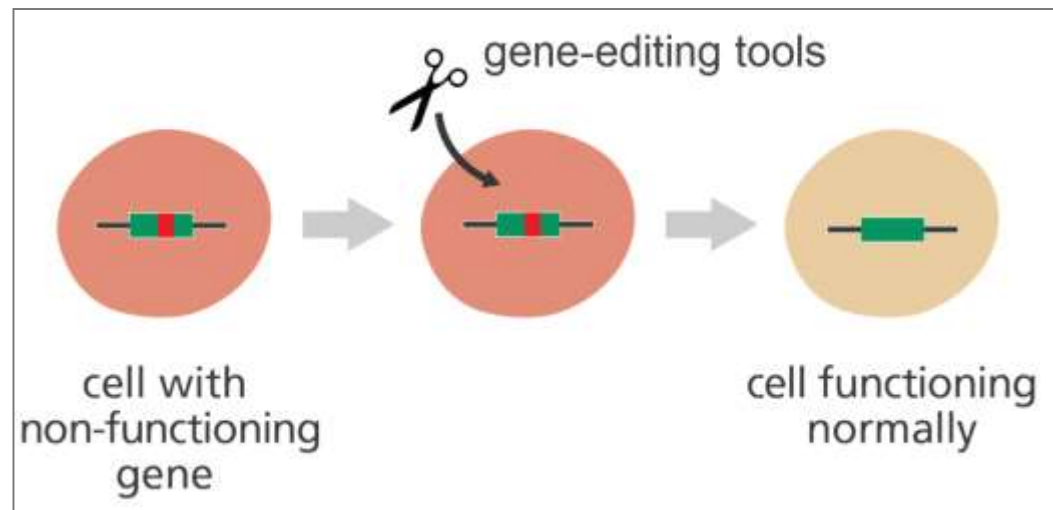
- vnesení plně funkční cDNA



- **Gene editing**

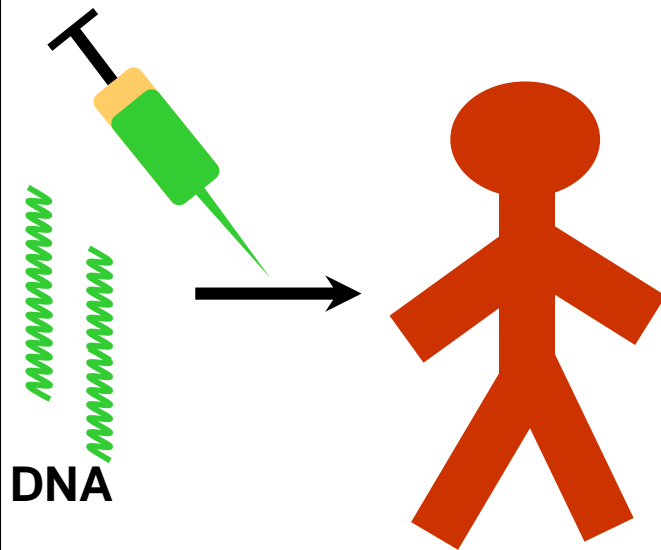
- specificky navržené nukleázy (CRISPRs...)

- opravný donor



Způsob podání

In vivo: přímá administrace



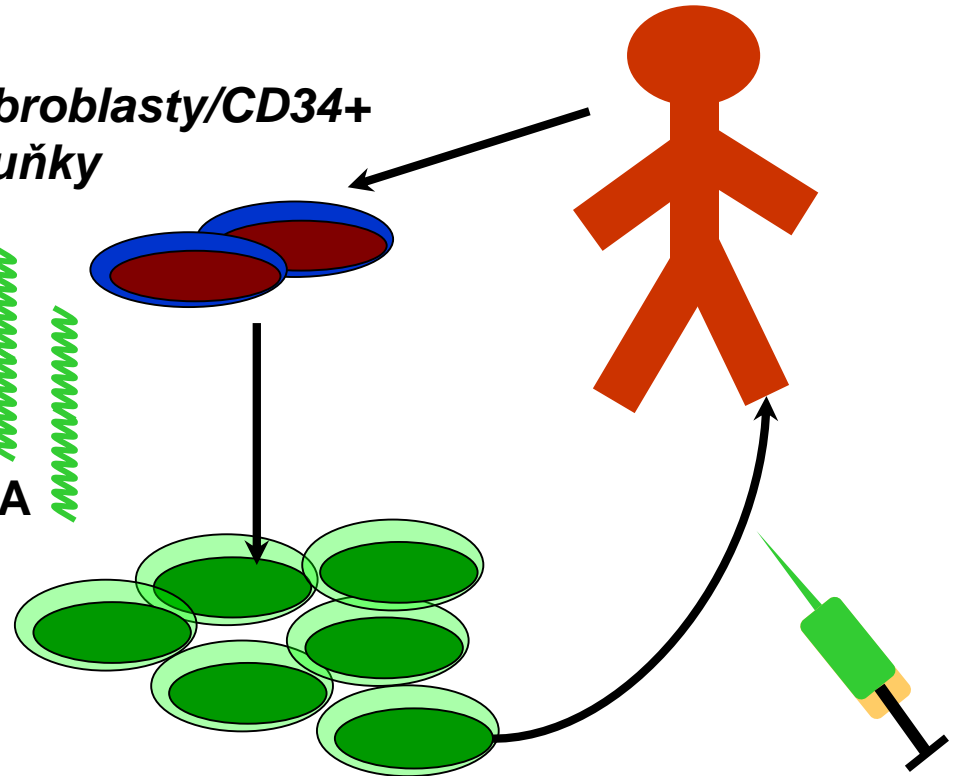
DNA

- méně pracné
- vhodné pro „highthroughput“
= komerční využití

Ex vivo:

*fibroblasty/CD34+
buňky*

DNA



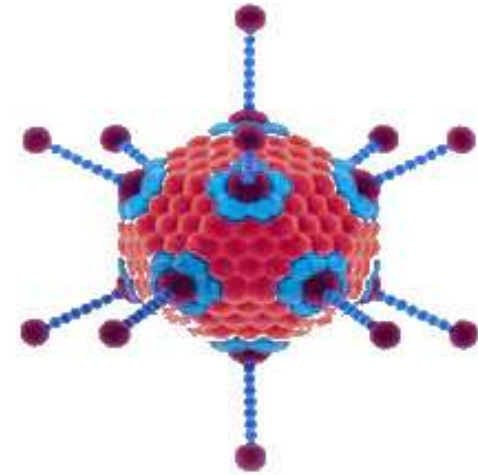
selekce+expanze

- pracné pro provedení
- individuální přístup
- vyšší účinnost, bezpečnější

Vektory v genové terapii

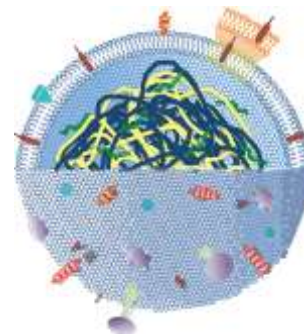
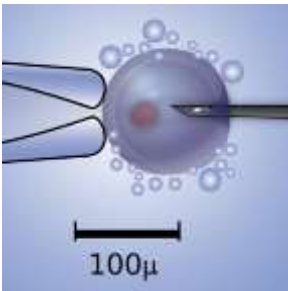
- virové

- vysoce účinné
- upravené
- adenovirus, retrovirus/lentivirus,
adeno-associated virus (AAV)
herpes-simples virus



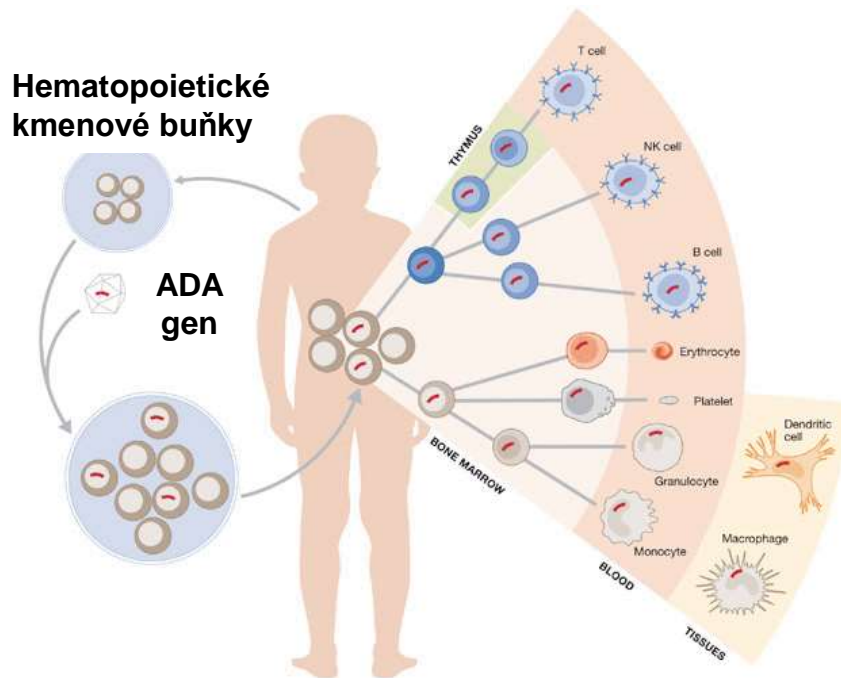
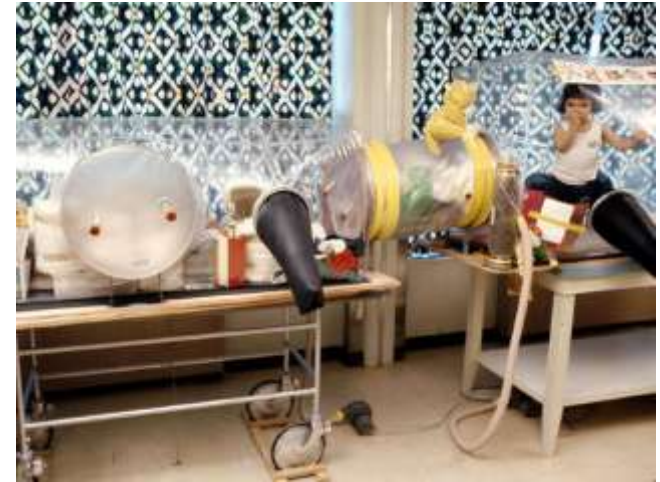
- nevirové

- **fyzikální** – microinjekce, electroporace, ultrazvuk, gene gun
- **chemické** – lipoplexy, polyplexy



ADA-SCID – imunodeficit

- **1971** – David Vetter - „the boy in the bubble“
- těžká kombinovaná imunodeficiencie
- mutace v adenosin deamináze
- 1/58 000 porodů
- **2016** – Genová terapie – **Strimvelis®**
- 700K USD

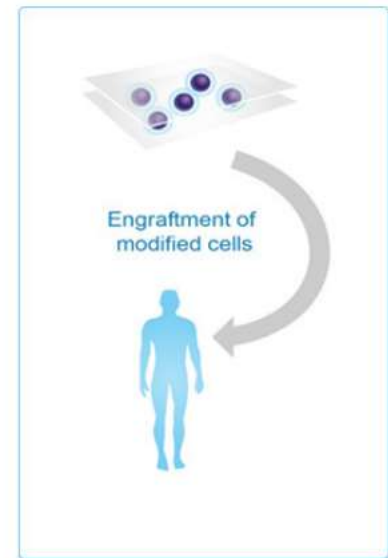
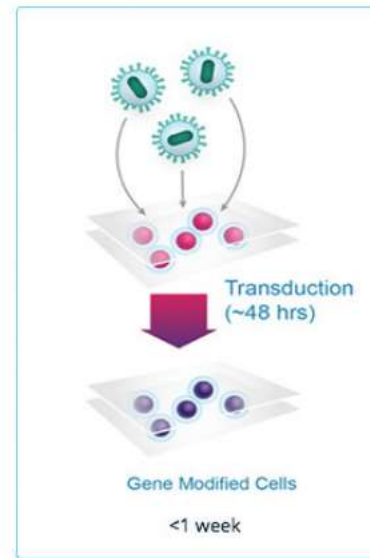
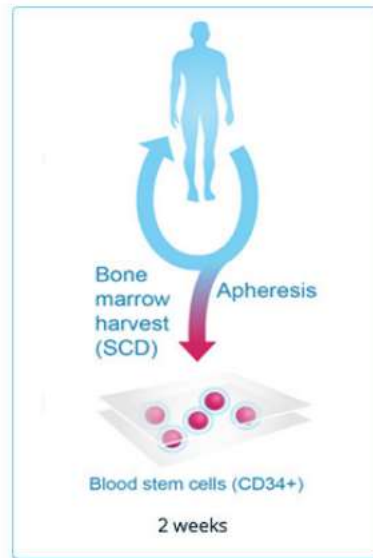
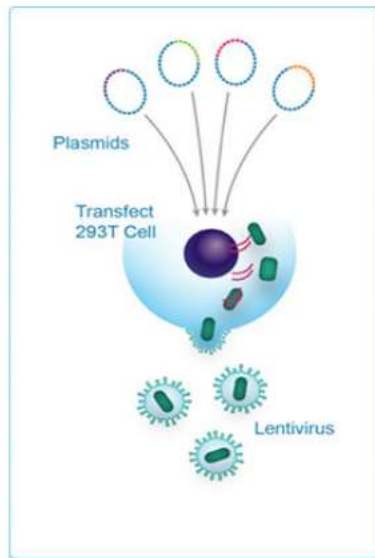


NASA JOHNSON SPACE CENTER

Genová terapie – Thalasemie a SCD

LentiGlobin BB305

- obsahuje anti-sickling aminokyselinu v sekvenci globinu



1/ Produce virus with therapeutic payload

Produce Lentiviral vector carrying a functional gene sequence.

2/ Isolate target cells from patient

Mobilize, extract and isolate patient's HSCs or T cells.

3/ Transduce target cells *ex vivo*

Insert target gene sequence into the patients HSCs or T cells.

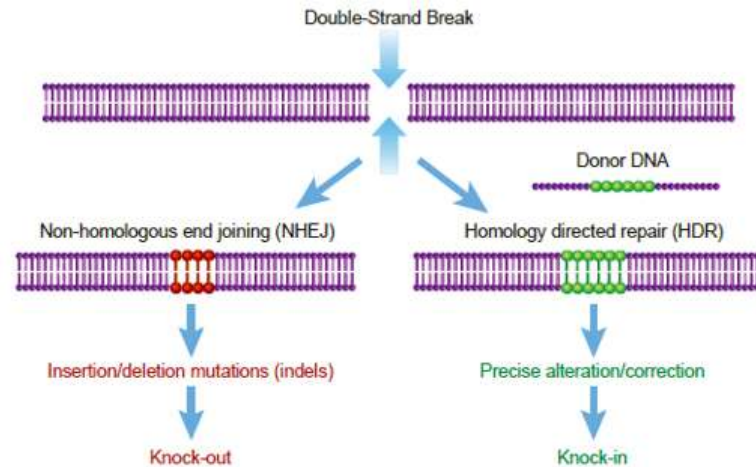
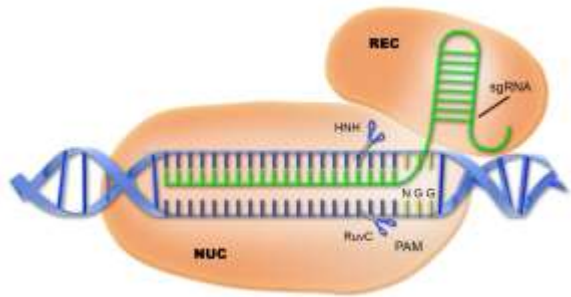
4/ Test & re-infuse gene modified cells

Prepare patient & re-infuse patient's correct HSCs or T cells.

- stabilní chimerismus 10–30% HSCs nesoucích BB305 stačí na dramatické zlepšení projevů jak B-thalasemie tak i SCD

Genová editace

- **Místně-specifická změna v DNA sekvenci**
- „custom-designed nucleases“ (ZNF, TALENs, **CRISPR/Cas9**)



- **Terapeutická aplikace:**

1) **Knock-out** vadného genu

- HIV infekce (CCR5), Huntingtonova chorea, Duchennova svalová dystrofie, **SCD** (BCL11A)

2) **Dokonalá oprava** kauzální mutace

- Epidermolysis bullosa, Fanconiho anemie, **SCD**, **B-thalasemie**

Molekulární diagnostika

Sekvenování nové generace (NGS)

Celý genom (3 miliardy nukleotidů, 98% nekódující DNA, 99,9% shoda mezi lidmi)

Exom: pouze geny kódující proteiny (méně než 2% DNA)

většina klinicky relevantních odchylek, šetří kapacitu strojů a výpočetní techniky

Amplikonové NGS (např. 400 vybraných genů)

Transkriptom (RNA-seq)-RNA

Metagenomika-např. střevní mikroflóra, virom

Analyzační proces

1. Vyloučeny geny vytipované na základě klinických příznaků (~30)

2. Filtrování a prioritizace nalezených změn:

odchylky od referenčního genomu:

↓ ~ 28 000

varianty s nízkou frekvencí v populaci (< 1-3%):

↓ ~ 4000

poškozující funkci proteinu:

↓ ~ 500

v genech asociovaných s konkrétní tkání/buňěčnou drahou...:

5

Co dál??

- **WES odhalí mutace již dříve popsané a validované jako kauzální**

X

- **WES nové mutace doposud nepopsané a neasociované s žádným onemocněním**

!! pouze nově objevených mutací je opravdu patogenní !!!



→ všechny nově objevené mutace musí být ověřen experimentálně!!

Molekulární hematologie nemaligních onemocnění

<http://clip.lf2.cuni.cz/en/>

Věda a výzkum
Projekty
Publikace
Prezentace ke stažení