

Úkryt HIV aneb jak se retroviry umlčují

Retroviry patří mezi jednoduché RNA viry, jejichž genetická informace obsahuje často pouhé tři geny. Přesto tyto viry vykazují vlastnosti, které jsou předmětem studia početných vědeckých týmů již desítky let, a stále zůstává mnoho otázek nezodpovězených (viz také články v Živě 2006, 1: 6–8; 2007, 5: 236–237 a na str. 105–106 tohoto čísla). Retroviry stejně jako jiné viry se snaží dostat do buňky a tam vytvořit své potomstvo. Ačkoli virová částice obsahuje jednořetězcovou RNA, dokáže její enzymatický aparát tento záznam převést do dvouřetězcové DNA a tu začlenit do genetické informace hostitele. Schopnost velmi účinné integrace do DNA hostitelské buňky je pro retroviry do jisté míry specifická a existuje jen málo skupin virů, které něco podobného také dokáží. Stát se součástí buněčné DNA je nezbytné pro přežití, a právě tato vlastnost představuje velký problém pro terapii chorob vyvolaných retroviry. Navíc sama o sobě integrace znamená pro hostitelský organismus jisté riziko. Následující článek ve stručnosti zmíní některé z těchto jevů.

Retroviry jsou nežádoucí, a tak se proti nim organismy různým způsobem brání. Obrana funguje jak na úrovni napadené buňky, tak na úrovni celého organismu ve formě imunitního systému. V současnosti je nejznámějším a nejlépe prostudovaným retrovirem HIV (Human Immunodeficiency Virus). Na něm si lze nejlépe popsat celý proces nákazy buněk retrovirem a důsledky, které z toho plynou. Infekce začíná stejně jako u většiny jiných virů vazbou virové částice na virový receptor. V případě HIV je touto molekulou protein CD4, nacházející se na povrchu některých buněk imunitního systému, jako jsou pomocné

T lymfocyty a makrofágy. K tomu, aby se HIV úspěšně dostal dovnitř buňky, potřebuje, aby na jejím povrchu byla přítomna ještě další molekula – koreceptor CCR5 nebo CXCR4. Tyto molekuly se nacházejí pouze na určitých buňkách imunitního systému a tím je také dáno, které buňky se mohou stát hostitelem viru. Jsou to právě výše zmíněné pomocné T lymfocyty a makrofágy. Pokud se v nich HIV masivně rozmnoží, dojde k uvolnění množství nových virových partikulí schopných infikovat další podobné buňky, a obvykle také k zániku hostitelské buňky. V případě nekontrolovaného množení viru by velmi brzy

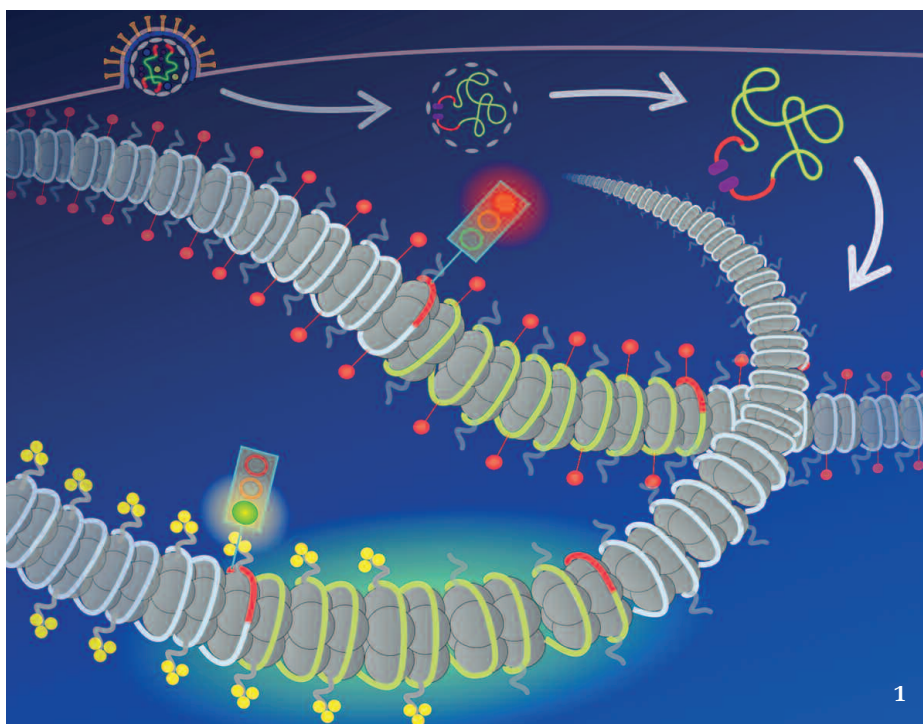
nastala zkáza T lymfocytů a makrofágů, a tedy rozsáhlé narušení imunitního systému. Organismus je však vybaven mnoha nástroji, kterými může proti HIV zasáhnout, a tyto zbraně jsou často velmi účinné.

Pomineme-li samotný adaptivní imunitní systém, schopný pomocí protilátek a cytotoxických T lymfocytů likvidovat virové partikule a nakažené buňky, existuje proti retrovirům určitá obrana i uvnitř buňky. Poté, co vnitřek virové partikule pronikne do buňky, proběhne reverzní transkripce, kdy se za pomoci virových proteinů přepisuje genetická informace retroviru ve formě jednořetězcové RNA do dvouřetězcové DNA. Ta může být následně začleněna do genetické informace hostitelské buňky. V tuto chvíli však nastupuje jeden z buněčných obranných mechanismů v podobě proteinu APOBEC3G, který rozpoznává jednořetězcovou molekulu DNA, přechodně vytvořenou během reverzní transkripce virového genomu, a mění některé báze v této molekule. Tím vlastně změní pomyslná písmena genetického kódu viru, ten ztrácí smysl a není schopen kódovat funkční proteiny. Výsledkem je buď poškozená DNA retroviru, kterou buňka rovnou zničí, nebo zdánlivě normální molekula DNA schopná putovat do jádra a tam se integrovat, není ale schopna vytvořit funkční virové proteiny, a tedy ani funkční virové potomstvo. Jde o poměrně účinný proces, dokáže velkou část virových částic zneškodnit dřív, než vůbec dostanou šanci začít se množit. Ovšem v případě HIV se tato zbraň do značné míry mívá účinkem, protože virus si vyvinul protizbraň – protein označovaný Vif. Ten dokáže zabránit, aby se antivirový APOBEC3G dostal do virové partikule, v níž dochází k syntéze virové DNA, a zároveň zajistí i likvidaci APOBEC3G v buňce. V případě HIV se tím zásadně snižuje účinnost obrany.

Cesta retrovirů mezi geny hostitelské buňky

Pokud retrovirus úspěšně pronikne do hostitelské buňky a podaří se mu přepsat svou genetickou informaci z RNA do DNA, může pokračovat dále do jádra a začlenit svou DNA do DNA hostitelské buňky. Celý proces zajišťuje virový protein integráza, která rozštěpí DNA hostitelské buňky, do daného místa vloží virovou DNA a spolu s opravnými mechanismy buňky místa napojení opět zacelí. Genetická informace viru se stává neoddelitelnou součástí genetické výbavy hostitelské buňky. V podstatě neexistuje žádný účinný mechanismus,

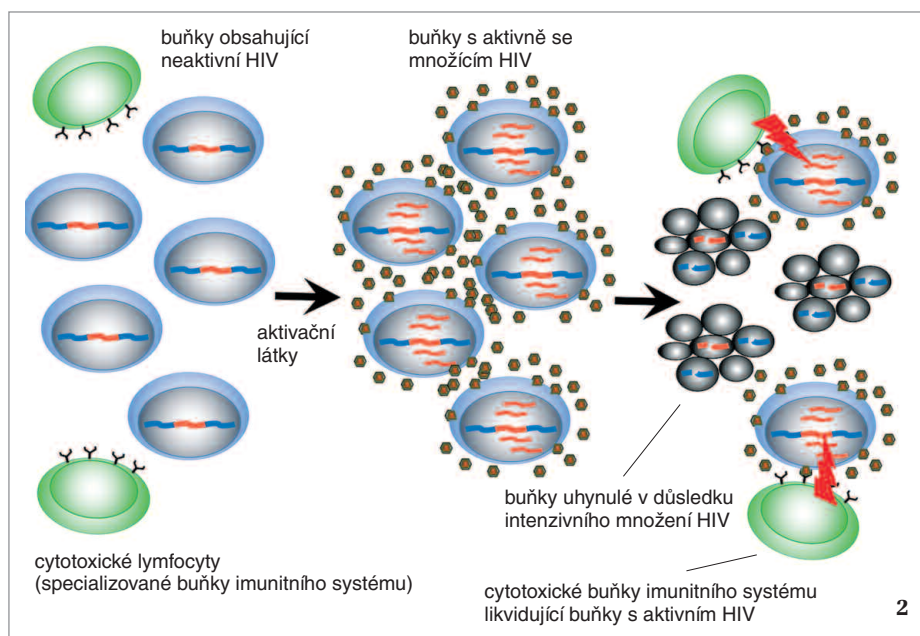
1 Schematické znázornění infekce buňky retrovirem. Zeleně jsou označeny dva retroviry integrované do různých oblastí jaderné DNA. Retrovirus začleněný do oblasti DNA asociované s modifikovanými proteiny nepodporujícími aktivitu genů (červené značky) je tzv. umlčený a jeho přítomnost se v buňce neprojeví (červený semafor). Naproti tomu retrovirus vložený v aktivní oblasti (trojice žlutých teček) zůstává aktivní a je schopen řídit produkci vlastních proteinů a tvorbu nových virových partikulí. Orig. P. Hradský, M. Auxt a F. Šenigl



jímž by se buňka dokázala už integrovaného virového genomu zbavit. To však nemusí znamenat, že je odsouzena k produkci virového potomstva a posléze k vlastního zániku. Analýzou integrovaných retrovirů bylo zjištěno, že velký podíl těchto retrovirů (mnohdy dokonce většina) je nefunkčních. To zčásti způsobuje aktivita výše zmíněného antivirového proteinu APOBEC3G, který poškozují a mutuje virovou DNA, a zčásti také nepřesnost virových enzymů přepisujících virovou RNA do DNA. V genetické informaci retroviru tak vznikají četné mutace vedoucí k jeho nefunkčnosti.

Jen část integrovaných retrovirů je schopna vytvořit funkční potomstvo. Zde se totiž mohou uplatnit další procesy, jež dále snižují pravděpodobnost pomnožení viru. Teprve po integraci do hostitelské DNA je retrovirus schopen začít přepisovat své geny do molekul RNA, podle nich jsou pak v buňce syntetizovány virové proteiny, a následně sestavováno virové potomstvo. Začlenění retroviru do buněčné DNA probíhá do jisté míry náhodně a ne všechny oblasti buněčné DNA podporují aktivitu genů. Může tak dojít k tomu, že zcela nepoškozený a dobře integrovaný retrovirus je „umlčen“. To znamená, že v oblasti buněčné DNA, která plní třeba jen strukturální funkci a není často přepisována do RNA, zůstane zcela neaktivní a jeho přítomnost se v buňce žádným způsobem neprojeví. Mechanismus, jakým buňka umlčí integrovaný retrovirus, zatím podrobněji neznáme. Pravděpodobně nejde o přímé vyhledávání cizorodých elementů v DNA buňky. Spíše hraje roli fakt, že se cizorodé elementy, jako např. retroviry, svou genetickou strukturou odlišují od genů hostitelské buňky. Navíc se mnohdy integrují do oblastí, které svou strukturou nejsou pro aktivitu genů vhodné, což vede k nestabilitě jejich aktivity nebo rovnou k rychlému umlčení. Různé retroviry se s tím vypořádávají odlišně. Některé se začleňují víceméně náhodně, a tak velká část integrací vede k umlčení retroviru a zabránění vzniku virového potomstva. Řada retrovirů si však i s takovou situací dokáže do určité míry poradit.

Jako příklad lze uvést virus myši leukemie, jehož preintegrační komplex (komplex virových proteinů a virové DNA odpovědný za integraci do hostitelské DNA) se váže s určitými buněčnými proteiny specifickými pro aktivní oblasti jaderné DNA. Tím zajistí směřování retroviru do blízkosti začátku jaderných genů (resp. genů v jádře buňky), kde je velmi pravděpodobné, že nedojde k umlčení virových genů. Podobnou strategii využívá také HIV. I zde se ukazuje určitá „rafinovanost“ tohoto viru, který na rozdíl od jednodušších retrovirů kóduje řadu malých přídatných virových proteinů zabezpečujících únik před různými obrannými mechanismy organismu i samotné hostitelské buňky. HIV nejenže nechává buněčnými proteiny směřovat svůj preintegrační komplex do aktivních jaderných genů, kde je menší pravděpodobnost jeho umlčení, ale kóduje i svůj vlastní aktivační protein zajišťující poměrně stálou a vysokou aktivitu virových genů. Touto další strategií zvyšuje svou úspěšnost.



Úkryt HIV

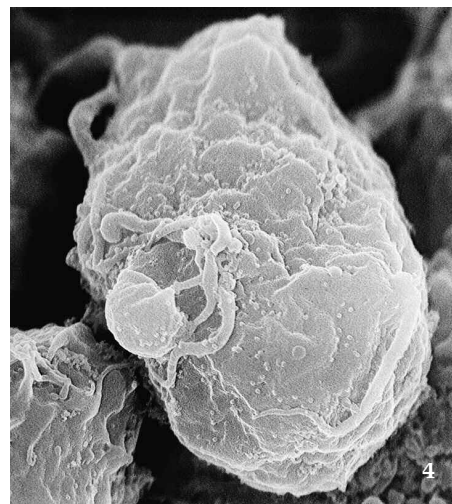
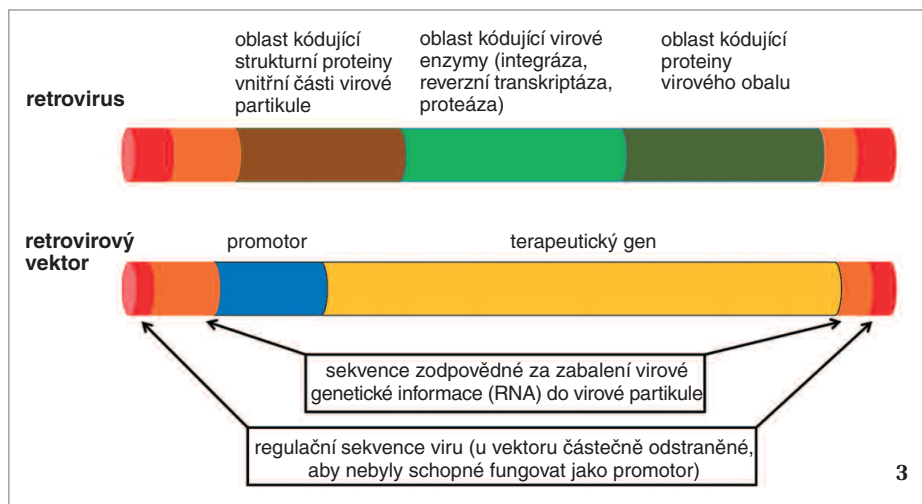
S integrací HIV a jeho umlčením souvisí jev zvaný latence – fenomén, který hraje důležitou roli v průběhu infekce HIV a zejména v následné terapii. V současné době pokročil výzkum a vývoj protivirotických látek tak daleko, že již dokážeme téměř úplně zastavit množení a především šíření HIV v organismu. Jde o látky potlačující aktivitu různých virových enzymů, a pokud jsou nasazeny ve vhodné kombinaci, daří se zastavit HIV natolik účinně, že ani velmi citlivé diagnostické metody v organismu takto léčeného pacienta nedetekují žádné virové částice. Pokud by šlo o virus postrádající schopnost integrace, byl by za takových podmínek nemocný poměrně snadno zbaven virové zátěže. Protivirotické látky by zásadně potlačily množení viru a imunitní systém by měl dostatek času pro kompletní vyčištění organismu od napačených buněk. V případě HIV to ale není možné a důvodem je právě začlenění viru do genetické výbavy buňky a jeho následné umlčení.

Samotná integrace je ještě zásadní problém neznamenala, protože kdyby virus byl stále aktivní, imunitní systém by takovou buňku dříve nebo později našel a odstranil. Problémem je, že se velmi brzy po infekci v organismu vytvoří latentní rezervoár viru, kdy se část integrovaných virů umlčí. Tím, že přestanou být aktivní, stávají se pro imunitní systém neviditelné, ale přitom v buňce zůstávají i nadále. K umlčení HIV dochází především v tzv. odpočívajících T lymfocytech, které v těle přežívají mnoho let a mohou být kdykoli stimulovány a aktivovány. Spolu s nimi může dojít také k aktivaci viru přečkávajícího v jejich genetické výbavě. To je důvodem, proč i pacienti léčení několik let antiretrovirovými (látkami bránícími množení a šíření retrovirů, v tomto případě HIV), u nichž po celou dobu léčby nebyl zjištěn žádný virus, vykazují rychlý nárůst koncentrace viru v krvi v okamžiku, kdy je léčba přerušena. Na vině jsou právě umlčené viry integrované převážně v odpočívajících T lymfocytech. Jejich umlčení však není stále a mohou se aktivovat zcela náhodně nebo spolu s aktivací T lymfocytu, v němž

přebývají, např. následkem jeho stimulace vyvolané infekcí jiným virem nebo bakterií. K aktivaci nějaké virové kopie přítomné v organismu dochází často, a proto pokud pacient vysadí léčbu, brzy se opět některá z kopií probudí k životu, v nepřítomnosti antiretrovirotik se rychle pomnoží a rozšíří do dalších buněk, kde pokračuje množení. Obvykle už dva týdny po vysazení léčby množství viru v organismu dosáhne podobné hladiny jako před léčbou.

Jestliže jsou však v těle pacienta stále přítomna HIV-specifická antiretrovirotika, v dané buňce se virus pomnoží a infikovaná buňka zaniká (v důsledku množení viru, nebo je rozpoznána imunitním systémem a zlikvidována), ale díky lékům nedojde k nákaze dalších buněk. Tímto způsobem se během let léčby antiretrovirovými rezervuáry umlčených kopií HIV v těle nemocného postupně ztenčují. Bohužel na tolik pomalu, že podle matematických modelů by na úplné vymizení latentního rezervoáru bylo třeba udržovat clonu antiretrovirotik po dobu 60–80 let. To znamená, že by nemocný užíval antiretrovirotika po zbytek svého života.

V současnosti vědci intenzivně pracují na vývoji strategií, které by dokázaly pacienta efektivně zbavit jeho latentního rezervoáru. Jednou z teoretických možností je přímé ničení virových kopií v organismu. Existují strategie, které v genetické výbavě buňky vyhledávají specifické sekvence DNA (v tomto případě sekvenci genomu HIV), a pak je vyštěpují nebo cíleně poškozují. Tyto postupy však nejsou zatím příliš efektivní a pravděpodobně by nedokázaly dostatečně účinně vyhledávat virové kopie a ničit je. Jako daleko nadějnější přístup se jeví strategie, pro kterou se vžil anglický název shock and kill, což by se dalo volně přeložit jako nastartuj a zabij. Spočívá v masivní aktivaci latentního rezervoáru viru pod clonou antiretrovirotik, jež by zabránila dalšímu šíření viru. Po takové aktivaci viru by nakažené buňky samy zahynuly nebo byly zlikvidovány imunitním systémem. Otázkou zůstává, jak latentní (umlčené) viry aktivovat. Jak už bylo řečeno, nacházejí se především v odpočívajících T lymfocytech, případně v makrofá-



2 Strategie zničení latentního rezervoáru HIV nazývaná anglicky shock and kill, nebo také kick and kill.

V těle HIV pozitivního pacienta se nachází velké množství buněk, které obsahují neaktivní (latentní) kopie tohoto viru. Nejsou imunitním systémem rozpoznávány a v organismu přetrvávají mnoho let. Působením některých specifických látek lze latentní virus aktivovat. Po aktivaci vede intenzivní množení viru často ke smrti hostitelské buňky nebo je buňka rozpoznána imunitním systémem jako infikovaná a následně zničena. Tato aktivace viru se provádí v přítomnosti antiretrovirotik, které brání infekci dalších buněk nově vzniklými virovými partikulami.

3 Schematické znázornění genetické informace obsažené v retroviru a retrovirovém vektoru. Retrovirový vektor má odstraněny všechny virové geny (přesněji řečeno otevřené čtecí rámce, části kódující proteiny), ponechány jsou pouze některé sekvence zodpovědné za zabalení RNA obsahující genetickou informaci vektoru do virové partikule, a také část regulačních sekvencí hrajících roli při přepisu virové RNA do DNA a její integraci do DNA hostitelské buňky.

4 HIV na lymfocytech ve skenovacím elektronovém mikroskopu. Virové částice (viriony) jsou patrné jako drobné útvary na povrchu buněk. Foto C. Goldsmith. Převzato z Wikimedia Commons v souladu s podmínkami použití

zích. Pokud dojde pomocí specifické stimulace k aktivaci těchto buněk, zpravidla ožije i v nich obsažený latentní virus. Výhodou je, že se množí natolik intenzivně, že hostitelskou buňku sám zabije. Experimenty s touto aktivací však ukázaly problém, který spočívá v masivním uvolnění prozáněťových látek aktivovanými lymfocyty a z toho vyplývající toxicitě. Proto se v současné době pokusy zaměřují spíše na strategie aktivace latentních virů bez aktivace hostitelských buněk.

Avšak ani tato strategie se neukázala jako účinný způsob zničení latentního rezervoáru. Existují látky, které dokáží umlčený virus aktivovat, aniž se aktivovala hostitelská buňka. Virus se začne v buňce množit, ale pokud není buňka v aktivovaném stavu, nemnoží se natolik intenzivně, aby sám buňku usmrtil. Pak nezbyvá než spo-

léhat na imunitní systém pacienta, aby buňky s aktivovaným virem našel a zničil. I zde terapie naráží na obtíže, kdy při dlouhodobé léčbě antiretrovirotiky není v důsledku účinného potlačení množení viru imunitní systém dostatečně připraven na likvidaci náhle se objevivšího viru. Jako slibné řešení se nabízí přechodí stimulace imunitního systému vakcínou obsahující virové antigeny (nejlépe izolované přímo z pacienta) a následná aktivace umlčených virů pod clonou antiretrovirotik. Nastimulovaný imunitní systém by měl být schopen velmi účinně buňky s aktivovaným virem najít a odstranit. Tato strategie proto v současnosti patří k nejintenzivněji testovaným. Poslední výzkumy ukazují, že jeden cyklus stimulace umlčených virů zdaleka nezvládne aktivovat všechny funkční umlčené kopie viru. Je ale velice pravděpodobné, že po několika cyklech stimulace (nejlépe za použití různých aktivních agens) a následného zničení buněk s aktivovaným virem bude rezervoár viru natolik redukován, že bude možné přinejmenším dlouhodobě přerušit terapii antiretrovirotiky a ulevit zátěži pacienta. Likvidace rezervoáru HIV nyní představuje jedinou překážku bránící úspěšnému vyléčení HIV pozitivních, ale i zde již byl učiněn velký pokrok. Nicméně na zásadní průlom stále čekáme.

Retroviry jako pomocníci

Pokud bychom se přesunuli do oblasti genové terapie, zjistíme, že retroviry a především HIV mohou být i zdatnými pomocníky v léčbě mnoha chorob. Genová terapie je založena na přenosu genetické informace do buněk nemocného, často za účelem léčby genetických chorob, kdy má pacient nefunkční určitý gen a z toho plyne rozvoj onemocnění. V těchto případech se jako nejúčinnější řešení nabízí vnesení funkčního genu do buněk pacienta. Typickým příkladem onemocnění, které se v současnosti experimentálně léčí pomocí genové terapie, je cystická fibróza. Jeden z postupů představuje inhalace virového vektoru přenášejícího funkční gen CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) ve formě aerosolu. Tento virus infikuje buňky plicního epitelu a vnese do nich chybějící gen, což vede k výraznému zlepšení funkce plicního epitelu a stavu pacienta. Dalším příkladem je léčba adrenoleukodystrofie (genetická porucha meta-

bolismu lipidů) nebo některých vrozených selhání imunity. Zmíněná onemocnění byla úspěšně léčena infekcí kmenových buněk kostní dřeně retrovirem přenášejícím terapeutický gen (funkční kopie genu, jehož aktivitu nemocný postrádá). Genová terapie se však neomezuje pouze na vrozené poruchy, ale také např. na léčbu rakoviny, kdy různě geneticky modifikované buňky imunitního systému mohou v těle ničit rakovinné buňky. Pro zmíněné účely je zapotřebí nějaký nástroj, který by dokázal efektivně proniknout do buněk pacienta a tam vložit příslušný terapeutický gen do genetické informace buňky. A zde se právě retroviry ukazují jako užitečné nástroje s velkým potenciálem. Kromě schopnosti integrace se u nich navíc daří nahrazovat proteiny v obalu virové partikule a tím určovat, které buňky bude příslušný vektor (retrovirus upravený pro přenos genetické informace) schopen infikovat a vnést do nich terapeutický gen.

Pro účely genové terapie je nezbytné odstranit z retroviru jeho vlastní geny a nahradit je geny, jež potřebujeme přenést. Naštěstí to není zásadní problém. Pokud se virus namnoží ve speciálních buňkách, které už virové geny obsahují, vytvoří takový vektor funkční virové partikule nesooucí kromě malé části genetické informace viru i vložený terapeutický gen. Partikule dokáží proniknout do cílové buňky a začlenit terapeutický gen do její DNA, nejsou ale schopny tvořit funkční potomstvo a nehozí rozvoj nežádoucí infekce. I v tomto případě se ukazuje HIV jako nejschopnější.

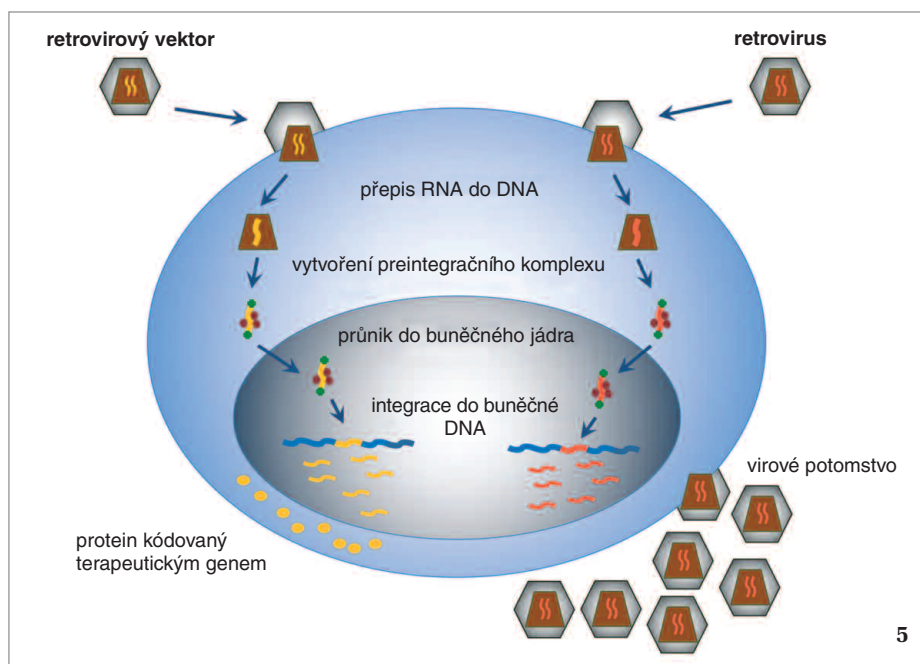
V prvních klinických zkouškách genové terapie se pracovalo s vektory odvozenými od viru myší leukemie, protože byl v té době dobře prozkoumán a hojně se užíval pro přenosy genů v experimentech. Jeho nevýhodou však je schopnost infikovat a integrovat se pouze do dělicích se buněk, a také jeho preference pro začlenění do těsné blízkosti začátku genů představuje určité riziko. Tyto oblasti obsahují důležité sekvence odpovědné za regulaci aktivity genu a integrace retroviru do těsné blízkosti jejich funkce ohrožuje. Gen se pak může vymknout kontrole regulačních mechanismů, což může vést až k nádorovému bujení. Také v případě některých klinických zkoušek došlo u části pacientů se syndromem SCID (Severe Combined Immunodeficiency Disease – vážné

kombinované selhání imunity) k rozvoji leukemie právě následkem této terapie.

V současné době se proto nejvíce využívají vektory odvozené od HIV. Často se označují jako lentivirové, protože HIV patří do podskupiny retrovirů nesoucí název lentiviry (*Lentiviridae*). HIV je schopen se velmi účinně začleňovat i do nedělicích se buněk a jen vzácně se integruje do blízkosti místa startu transkripce (TSS – Transcription Start Site). Většinou se naopak začleňuje dovnitř aktivních genů, kde představuje daleko menší riziko ovlivnění genové regulace. Svým vložením sice může příslušný gen poškodit, ale protože většinu genů máme ve dvou aktivních kopiích, poškození jedné z nich zpravidla neznamená velké riziko pro funkci buňky.

V oblasti genové terapie se z hlediska umlčení retroviru, resp. retrovirového vektoru řeší opačný problém než v případě retrovirových infekcí. Zde je potřeba, aby byl retrovirový vektor co nejméně aktivní, a navíc stabilně po mnoho let. Vektory odvozené od HIV mají díky své preferenci pro integraci do aktivních genů větší šanci zůstat dlouhodobě aktivní než vektory integrující se náhodně, protože prostředí aktivních jaderných genů obecně podporuje aktivitu jakýchkoli genů, i cizorodého původu. Avšak jak bylo zmíněno v části o latenci HIV, i zde dochází k rozsáhlému umlčování. Velká část kopií se umlčí ihned po začlenění do buněčné DNA a ty kopie, které zůstanou i poté aktivní, často během několika měsíců svou aktivitu ztratí. To je pro účely genové terapie nežádoucí, protože postupy spojené s masivní infekcí cílových buněk pacienta retrovirovým vektorem bývají velkým zásahem do organismu a obvykle není možné je opakovat příliš často.

Z tohoto důvodu se intenzivně experimentuje s různými sekvencemi DNA, jež by dokázaly retrovirový vektor ochránit před umlčením, a zajistit tak dlouhotrvající nebo pokud možno trvalou aktivitu vneseného terapeutického genu. Brzy se ukázalo, že není vhodné ve vektorech používat původní virové promotory (sekvence DNA nacházející se na začátku genu, které regulují jeho aktivitu), protože nezaručovaly dostatečnou stabilitu genové aktivity. Daleko vhodnější je použití promotoru pocházejícího přímo z buňky hostitele, tedy člověka. Pro tyto účely byly vybrány promotory aktivní ve všech lidských buňkách, u nichž lze očekávat, že budou schopny zajistit stabilní aktivitu terapeutického genu. Jejich použití opravdu stabilitu genové aktivity zvýšilo, ale i tyto vektory byly do značné míry postupně umlčeny. Je to způsobeno především tím, že retroviry se integrují většinou náhodně a stabilitu jejich aktivity zásadně ovlivňuje kontext, ve kterém se nacházejí, tedy daná oblast buněčné DNA. Bylo by samozřejmě možné problém s umlčováním částečně překonat masivní infekcí, při níž bychom spolehnali, že se některé vektory dostanou do oblasti, kde budou stabilně aktivní. To by však byl poněkud riskantní přístup, protože právě díky náhodnosti integrace je vždy riziko, že retrovirový vektor naruší regulaci důležitého buněčného genu a vše vyústí v nádorové bujení. Nebezpečí není u vektorů odvozených od



HIV našťastí příliš velké, ale rozhodně nelze vyloučit. Z tohoto důvodu je nutné vytvořit vektor co nejméně podléhající umlčení, aby se daly používat pro účely terapie co nejnižší dávky viru a minimalizovalo se riziko nežádoucích změn v jaderné DNA.

Jednu z testovaných strategií představuje vložení CpG ostrova (oblast, kde se v sekvenci DNA velmi často vyskytují CG, nukleotid tvořený cytozinem a guaninem) do retrovirového vektoru. Jde o oblasti DNA, které bývají přítomny u promotorů genů velice aktivních ve většině buněk organismu a určitým způsobem zodpovídají za stabilitu jejich aktivity. Dodnes není mechanismus jejich účinku zcela vysvětlen, ale samotné CpG ostrovy a jejich nejbližší okolí obvykle vykazují charakteristiky aktivních oblastí DNA bez ohledu na jejich pozici v genetické informaci buňky. Tyto ostrovy však bývají příliš velké, aby se daly celé vložit spolu s terapeutickým genem do vektoru. A tak hledáme sekvence odpovědné za ochrannou funkci CpG ostrovů, abychom mohli vytvořit jakýsi CpG miniostrov a ten vložit do retrovirového vektoru. Jedním z příkladů je CpG ostrov genu *aprt*. Již dříve bylo popsáno jakési jádro tohoto ostrova zodpovědné za jeho vlastnosti. V naší laboratoři jsme vložili dvě upravené kopie tohoto jádra do retrovirového vektoru a došlo k výraznému zvýšení jeho odolnosti proti umlčení. Tento výsledek naznačuje, že CpG ostrovy představují jednu ze slibných strategií stabilizace aktivity genů přenášených retrovirovými vektory. Další možnost nabízejí tzv. chromatinové izolátory. Umlčování retrovirových vektorů je způsobeno především negativním vlivem sekvencí buněčné DNA obklopující integrovaný vektor. Chromatinové izolátory dokáží tyto vlivy „odstínit“. Pokud se tedy retrovirový vektor nachází v blízkosti rozsáhlé neaktivní oblasti genomu, která by pravděpodobně zapříčinila jeho umlčení, dokáže chromatinový izolátor umístěný mezi retrovirus a tuto oblast zabránit jejímu negativnímu vlivu na vektor a udržet ho aktivní. Příkladem je izolátor cHS4

5 Srovnání infekce buňky retrovirem a retrovirovým vektorem. Retrovirový vektor dokáže proniknout do buňky, přepsat svou genetickou informaci obsaženou v RNA do DNA a tuto DNA vložit do DNA hostitelské buňky (v případě vektoru se označuje jako cílová buňka). Po integraci zůstává vektor aktivní a zajišťuje produkci proteinu kódovaného terapeutickým genem, který nese. Protože neobsahuje virové geny, není schopen se množit, vytvořit nové partikule a dále se v organismu šířit. Všechny orig. F. Šenigl, není-li uvedeno jinak

objevený v blízkosti kuřecího genu pro β -globin. Jeho vložení do retrovirového vektoru výrazně omezilo vliv sekvencí obklopujících místo integrace a tím stabilizovalo aktivitu vektoru. Ovšem i zde nastává podobný problém jako v případě CpG ostrovů, kdy musíme zmenšit velikost tohoto elementu, aniž bychom oslabili jeho účinnost.

Ve vývoji retrovirových vektorů pro účely genové terapie se za poslední desetiletí učinil velký pokrok jak z hlediska zvyšování účinnosti přenosu genů, tak ve snižování možných rizik spojených s jejich použitím. Díky tomu jsou v současné době následky genové terapie v podobě zhoubného nádoru naprosto výjimečné.

Retroviry byly objeveny jako patogeny schopné integrovat se do DNA hostitelské buňky, teprve po čase se začalo uvažovat o využití této jejich vlastnosti pro vědecké a lékařské účely. Je zřejmé, že retrovirus umí být zdatným protivníkem při léčbě jím vyvolaných chorob, ale pokud je příslušným způsobem pozměněn, může sloužit jako stejně zdatný pomocník.

Mgr. Filip Šenigl, Ph.D., působí v Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., na oddělení Virové a buněčné genetiky vedeném RNDr. Jiřím Hejnarem, CSc., jehož tým získal v r. 2014 Cenu Akademie věd ČR za dosažené vynikající výsledky velkého vědeckého významu v oblasti transkripční regulace retrovirů, retrovirových vektorů a retrotranspozonů.