

BIBLIOTECA DE cDNA E PRINCÍPIOS DE TERAPIA GÊNICA

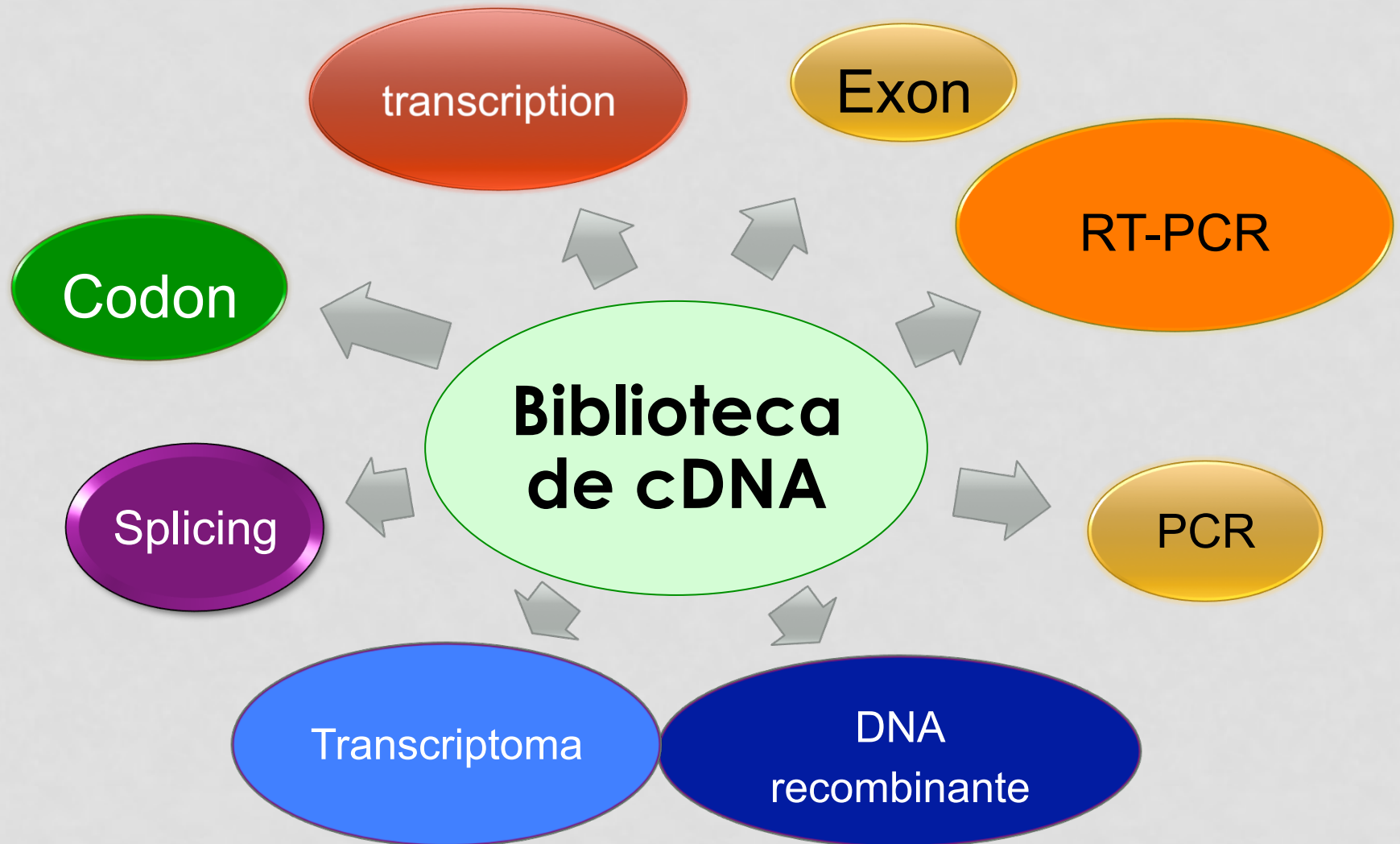
APARECIDA MARIA FONTES

24 de Março de 2017

BIBLIOTECA DE cDNA

PARTE 1

CONCEITOS ASSOCIADOS COM BIBLIOTECA DE cDNA



DEFINIÇÕES

O Que é transcrição?

- ☐ É o processo pelo qual a informação em uma fita de DNA é copiada em uma nova molécula de RNAm.

Qual a enzima responsável pela transcrição?

- ☐ Transcrição é realizada por uma enzima denominada RNA polimerase e um conjunto de proteínas acessórias denominadas fatores de transcrição.

DEFINIÇÕES

O Que é exon?

- ❑ São as regiões codificantes de um RNA transcrito que são traduzidas em proteína.

O Que é "splicing"?

- ❑ Processo de modificação que ocorre no núcleo, durante o qual, os íntrons são removidos e permanecem somente os exons.
- ❑ "*Splicing*" produz uma molécula de RNA madura que é traduzida em proteína.

Além do “splicing” alternativo, quais são os outros mecanismos que permitem que cada gene produzir mais de um variante de mRNA?

- ☐ Edição do RNA.
- ☐ Sítios alternativos de início da transcrição.
- ☐ Sítios alternativos de término da transcrição.

QUESTÕES

Uma simples sequência de genoma mostra a complexidade do mesmo?

Como podemos ter conhecimento do nível de complexidade do genoma?



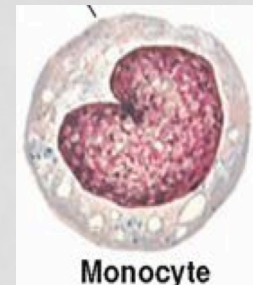
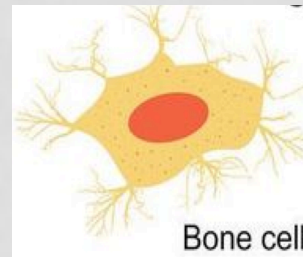
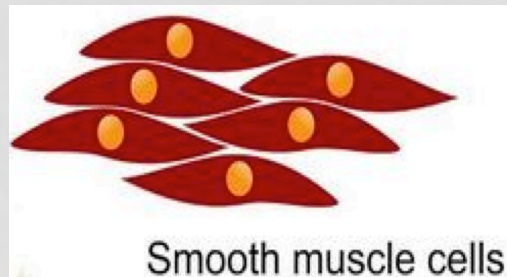
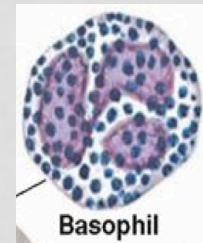
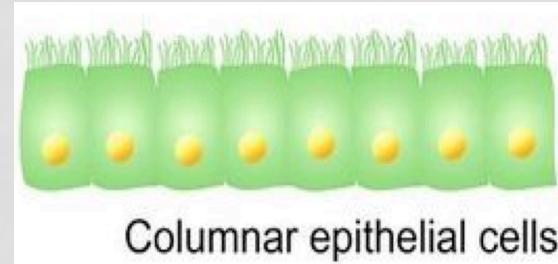
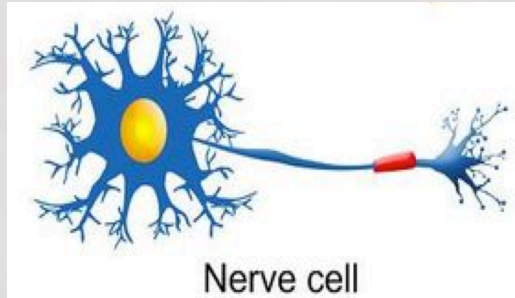
Transcriptoma

DEFINIÇÕES

O Que é transcriptoma?

- ☐ É o conjunto de todas moléculas de RNA mensageiro ou transcritos expressos por um organismo.
- ☐ O termo transcriptoma pode também ser utilizado por uma célula em particular ou por um tecido específico.
- ☐ Ao contrário do *genoma* que é caracterizado por sua estabilidade, o transcriptoma muda ativamente.
- ☐ Por exemplo, de acordo com o estágio do desenvolvimento ou as condições ambientais.

As diferentes células de um organismo compartilham o mesmo material genético?



O que diferencia as células entre si?

As diferenças entre as células são os genes que as mesmas expressam conforme o tipo celular e o estágio do desenvolvimento.



Como podemos estudar os genes expressos por um tipo celular, ou um tecido específico ou em uma fase do desenvolvimento?



Por meio da construção de bibliotecas contendo todos os genes expressos de um órgão ou uma fase do desenvolvimento.

Como denomina-se esse tipo de biblioteca contendo todos os genes expressos em um órgão ou em um período do desenvolvimento ?



Biblioteca de cDNA.

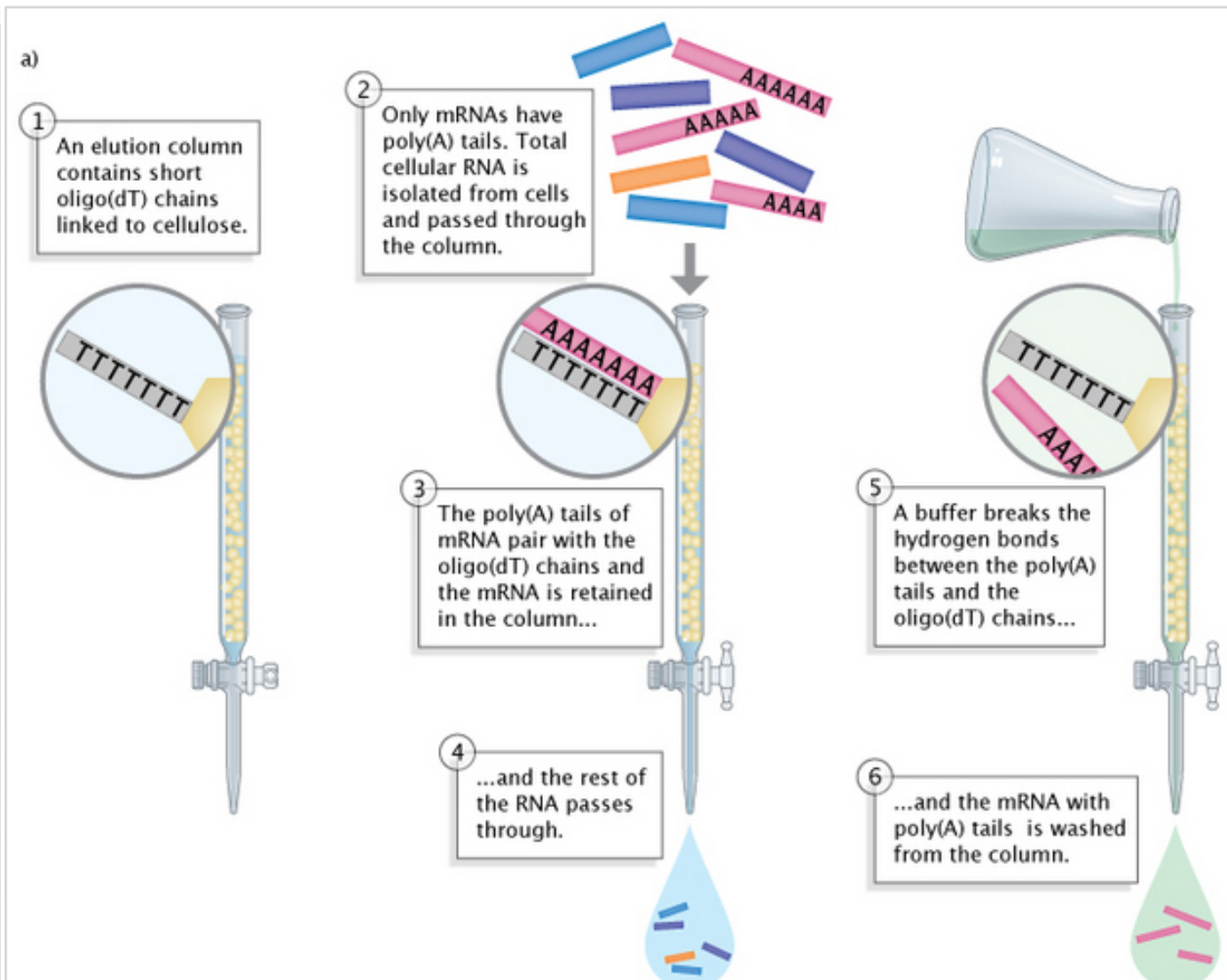


O que precisamos para construir uma biblioteca de cDNA?



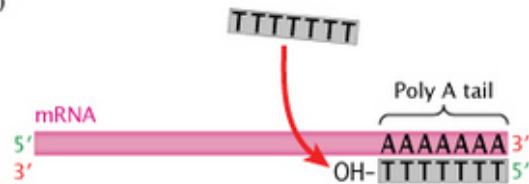
Aula 13/03

PASSO 1 - ISOLAMENTO DO mRNA UTILIZANDO UMA COLUNA DE ELUIÇÃO



PASSO 2: SÍNTESE DE DNA PELA TRANSCRIPTASE REVERSA UTILIZANDO mRNA COMO MOLDE

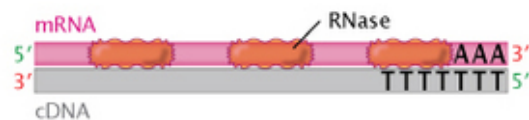
b)



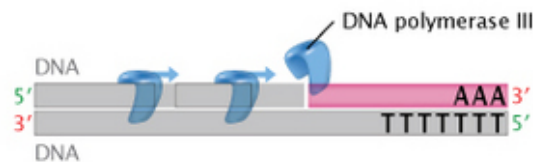
7 Oligo(dT) primers are added, which anneal to the poly(A) tails of the mRNA and provide 3'-OH groups for DNA synthesis.



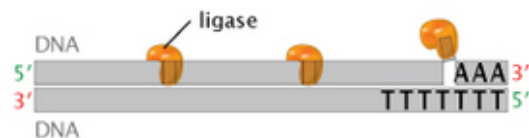
8 Reverse transcriptase synthesizes a DNA strand by using the mRNA as a template.



9 The RNA-DNA hybrid molecule is briefly treated with RNase, which partly digests the RNA strand.



10 DNA polymerase is used to synthesize the second DNA strand by using the short un-digested RNA pieces as primers.



11 The nicks in the sugar-phosphate backbone are sealed by DNA ligase.

DEFINIÇÕES

O que é biblioteca de cDNA?

- ❑ Conjunto de clones que representam os mRNAs expressos por determinado tipo de célula e em determinado período do desenvolvimento.
- ❑ A diversidade e abundância de cada mRNA é específica para cada RNA.



O Conjunto de clones independentes é denominado BIBLIOTECA de cDNA.

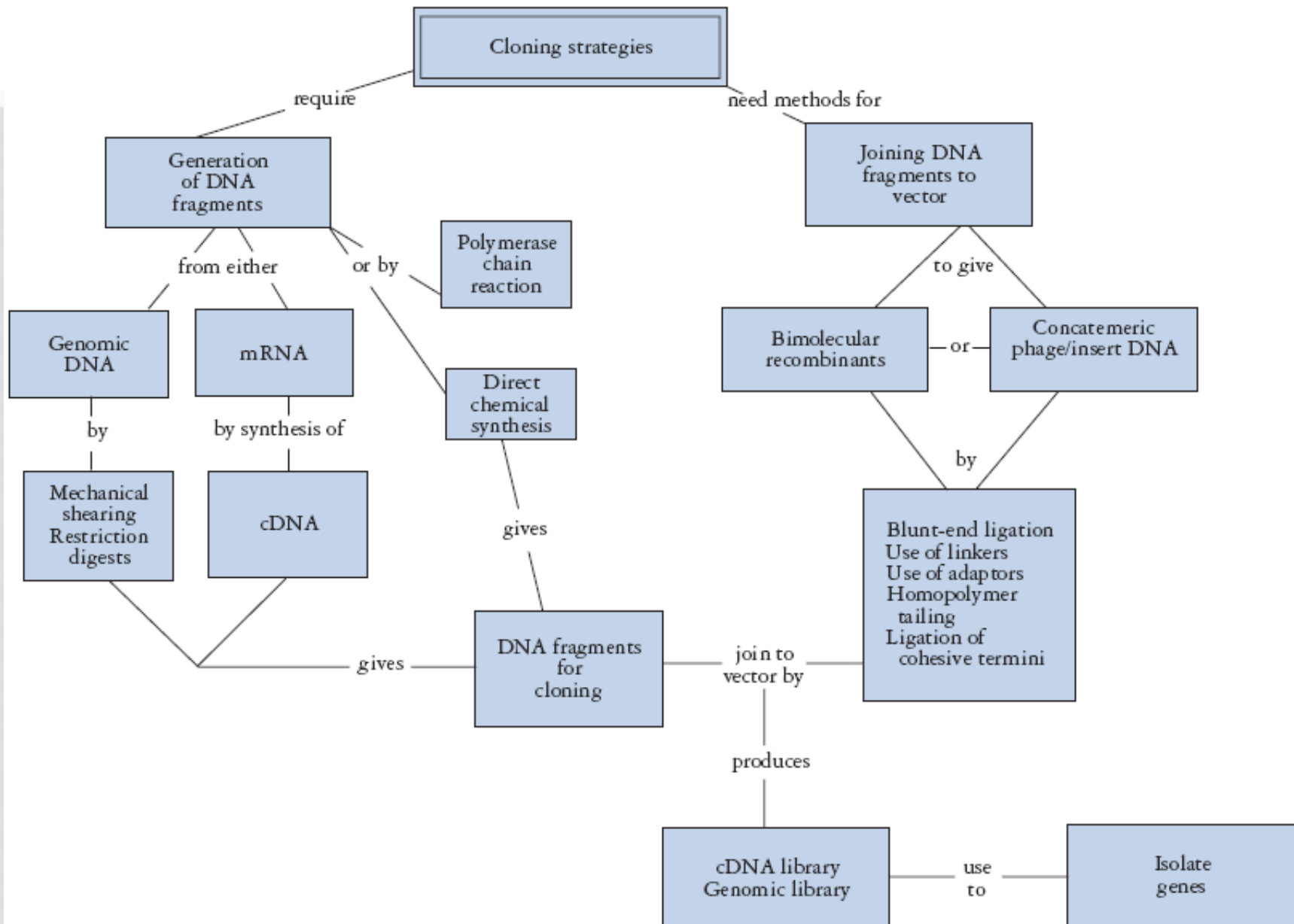
CONCEITOS RELATIVOS À BIBLIOTECA DE cDNA

- ❑ A abundância de determinado clone na biblioteca irá depender da abundância do mRNA na célula.
- ❑ Quanto maior a abundância de determinado mRNA, maior a facilidade para seu isolamento.



Table 6.1. mRNA abundance classes		
Source	Number of different mRNAs	Abundance (molecules/cell)
Mouse liver cytoplasmic poly(A) ⁺ RNA	9	12000
	700	300
	11500	15
Chick oviduct polysomal poly(A) ⁺ RNA	1	100000
	7	4000
	12500	5

MAPA CONCEITUAL DE BIBLIOTECA GENÔMICA E DE cDNA



TIPOS DE GENES ALVOS IDENTIFICADOS PELA ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS CANCERÍGENAS

Possible targets for therapy

Gain of expression

Oncogene amplified or rearranged in genome

Oncogene activated by point mutation

Other oncogenic or signalling proteins with cancer-restricted overexpression

Tumour-endothelium-expressed proteins

Target characteristics (revealed by further analysis)

Vital function
in tumour

Tumour-specific and
immunogenic

Cell-surface expression

Therapeutic approach

Small molecules, biologics
siRNA, ribozymes, etc.

Tumour vaccine
development

Monoclonal
antibodies, aptamers



TIPOS DE GENES ALVOS IDENTIFICADOS PELA ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS CANCERÍGENAS

Possible targets for therapy

Target characteristics
(revealed by further analysis)

Therapeutic approach

Loss of expression

Loss of tumour suppressor

Loss of gene(s) in deleted region
of chromosome

Loss of expression of
downstream gene

Lost protein is widely
expressed in normal cells

Chemical synthetic
lethal screen

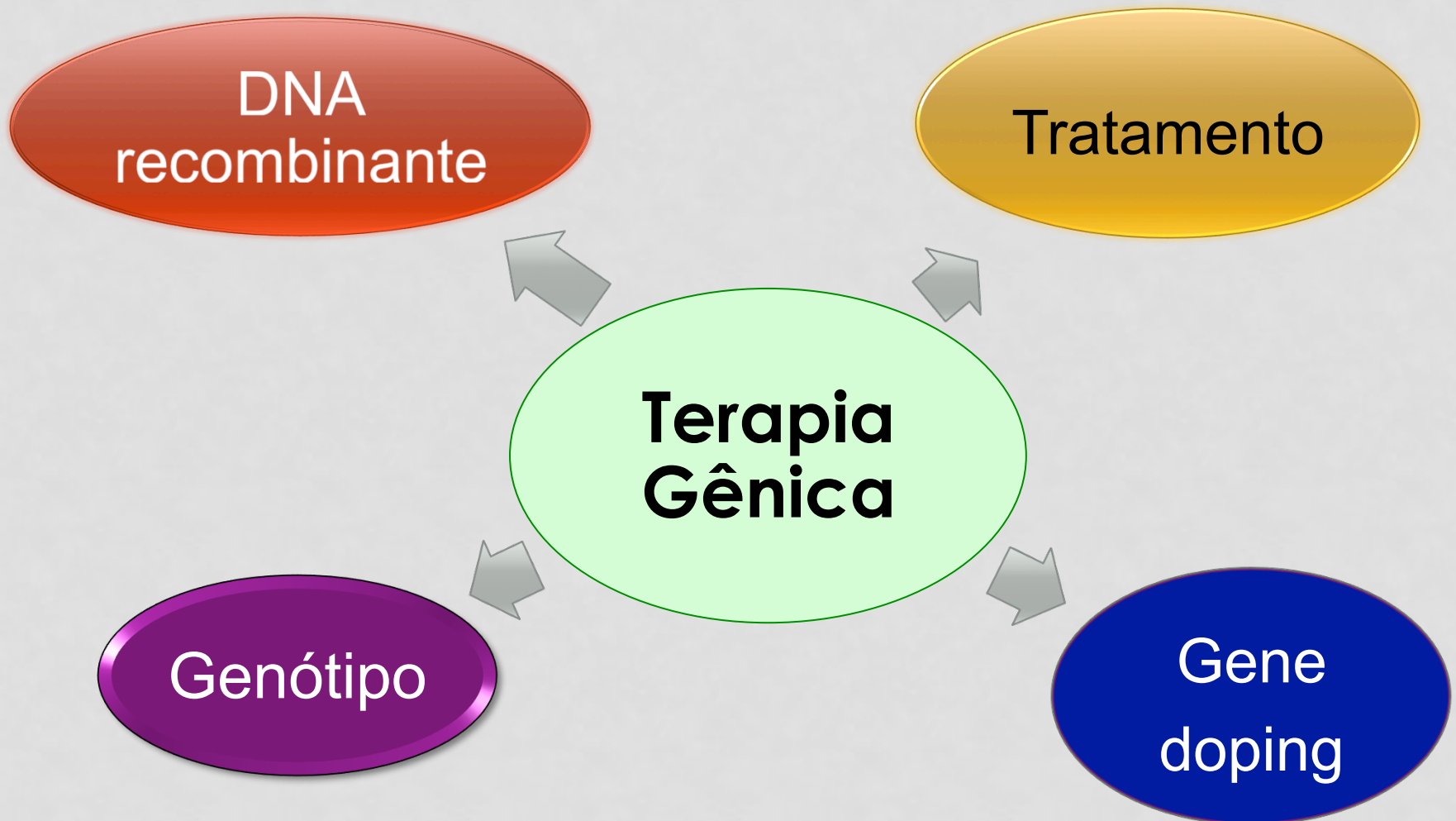


Espera-se identificar novas vias de diagnóstico e realizar a predição sobre a resposta à drogas, conhecido como farmacogenômica.

PRINCÍPIOS DE TERAPIA GÊNICA

PARTE 2

CONCEITOS ASSOCIADOS COM TERAPIA GÊNICA (4)



DEFINIÇÕES

O que é terapia gênica?

- ☐ É o uso do DNA recombinante para tratar uma doença genética ou para modificar a célula de um paciente.

O que é o genótipo?

- ☐ Mapa genético ou o conjunto completo de genes de um organismo.
- ☐ Conjunto de alelos de um organismo.

DEFINIÇÕES

O que é organismo diplóide?

- ❑ Tem dois alelos em cada posição genética ou *locus*, um alelo herdado do pai e outro alelo herdado da mãe.
- ❑ Cada par de alelos representa o genótipo de um gene específico.
 - ✧ Genótipo homozigoto = tem dois alelos idênticos.
 - ✧ Genótipo heterozigoto = tem dois alelos diferentes

O que é o genótipo heterozigoto composto?

DEFINIÇÕES

O que é “gene doping”?

- ❑ Modificação do DNA de um atleta com a proposta de aperfeiçoamento do desempenho esportivo (contra ética esportiva).

Outros termos associados com tratamento

✧ Drogas

✧ Bioética

✧ Farmacogenômica

✧ Fertilização *in vitro*

✧ Células tronco

TIPOS DE TERAPIA GÊNICA

❑ **Terapia Gênica Somática**

- ✧ Modifica o DNA de células ou tecidos específicos do próprio indivíduo.

❑ **Terapia Gênica de Linhagem germinativa**

- ✧ Molécula de DNA do gameta, zigoto ou embrião em estágios iniciais e essa modificação será transmitida para gerações futuras.

PRINCIPAIS PARÂMETROS (5) A SEREM ANALISADOS EM UM PROTOCOLO DE TERAPIA GÊNICA

❑ Escolha do Gene Terapêutico

- ✧ Gene codificante para proteína versus RNA não codificador

❑ Rota de administração

- ✧ Isolamento da célula do paciente seguida da transferência gênica no laboratório.



Terapia Gênica *ex-vivo*

- ✧ Administração direta do gene no paciente.



Terapia Gênica *in-vivo*

PRINCIPAIS PARÂMETROS (5) A SEREM ANALISADOS EM UM PROTOCOLO DE TERAPIA GÊNICA

❑ **Método de entrega do gene terapêutico: dependente do tipo de vetor utilizado**

✧ Métodos físicos (eletroporação) ou químicos (lipídeos catiônicos).



Transfecção

✧ Métodos Biológicos (vetores virais).



Transdução

PRINCIPAIS PARÂMETROS (5) A SEREM ANALISADOS EM UM PROTOCOLO DE TERAPIA GÊNICA

- ☐ **Célula Alvo: dependente da doença genética**
- ☐ **Persistência da expressão do gene terapêutico**
- ☐ **Resposta imunológica a terapia gênica**

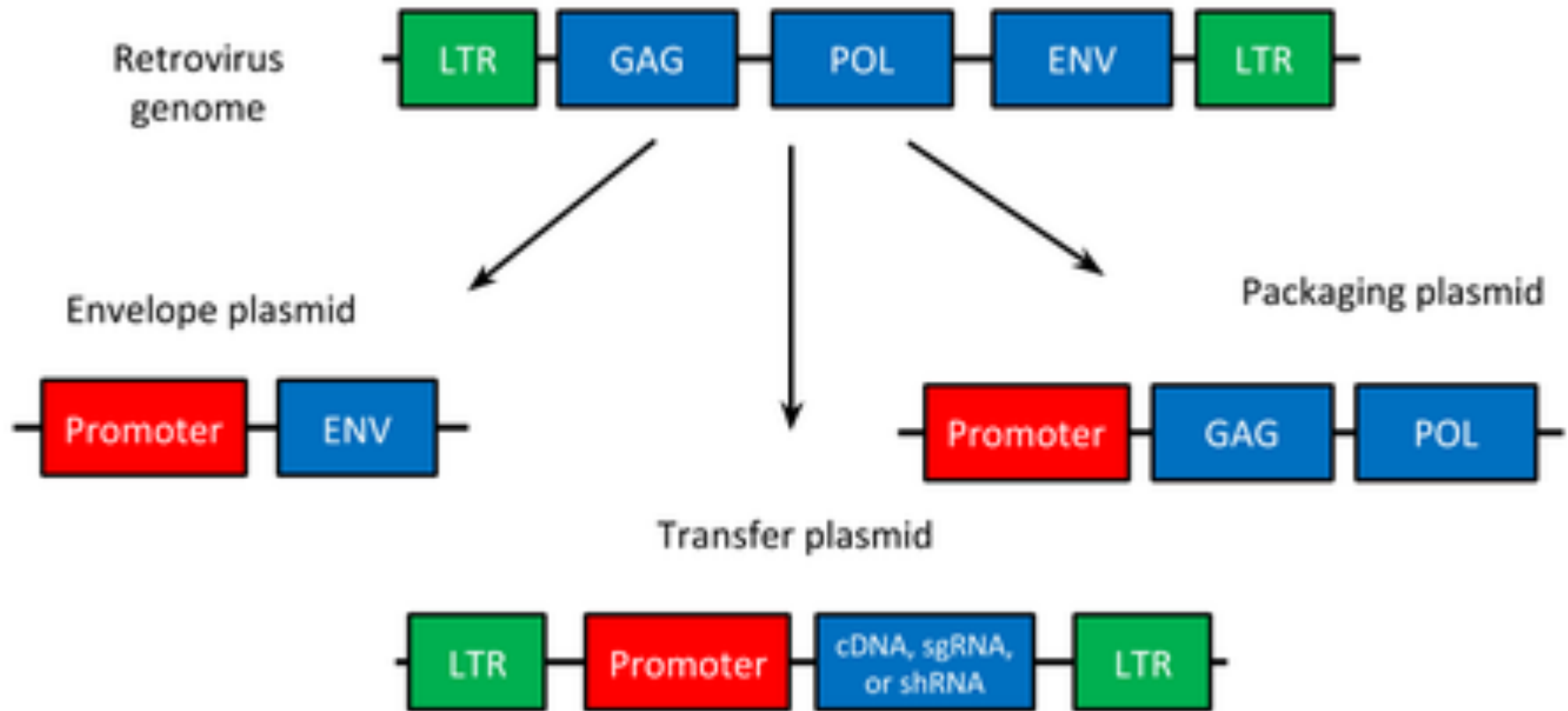
TIPOS DE VETORES VIRAIS PARA TERAPIA GÊNICA

Vector	Genetic material	Packaging capacity	Tropism	Inflammatory potential	Vector genome forms
<i>Enveloped</i>					
Retrovirus	RNA	8 kb	Dividing cells only	Low	Integrated
Lentivirus	RNA	8 kb	Broad	Low	Integrated
HSV-1	dsDNA	40 kb* 150 kb‡	Strong for neurons	High	Episomal
<i>Non-enveloped</i>					
AAV	ssDNA	<5 kb	Broad, with the possible exception of haematopoietic cells	Low	Episomal (>90%) Integrated (<10%)
Adenovirus	dsDNA	8 kb* 30 kb§	Broad	High	Episomal

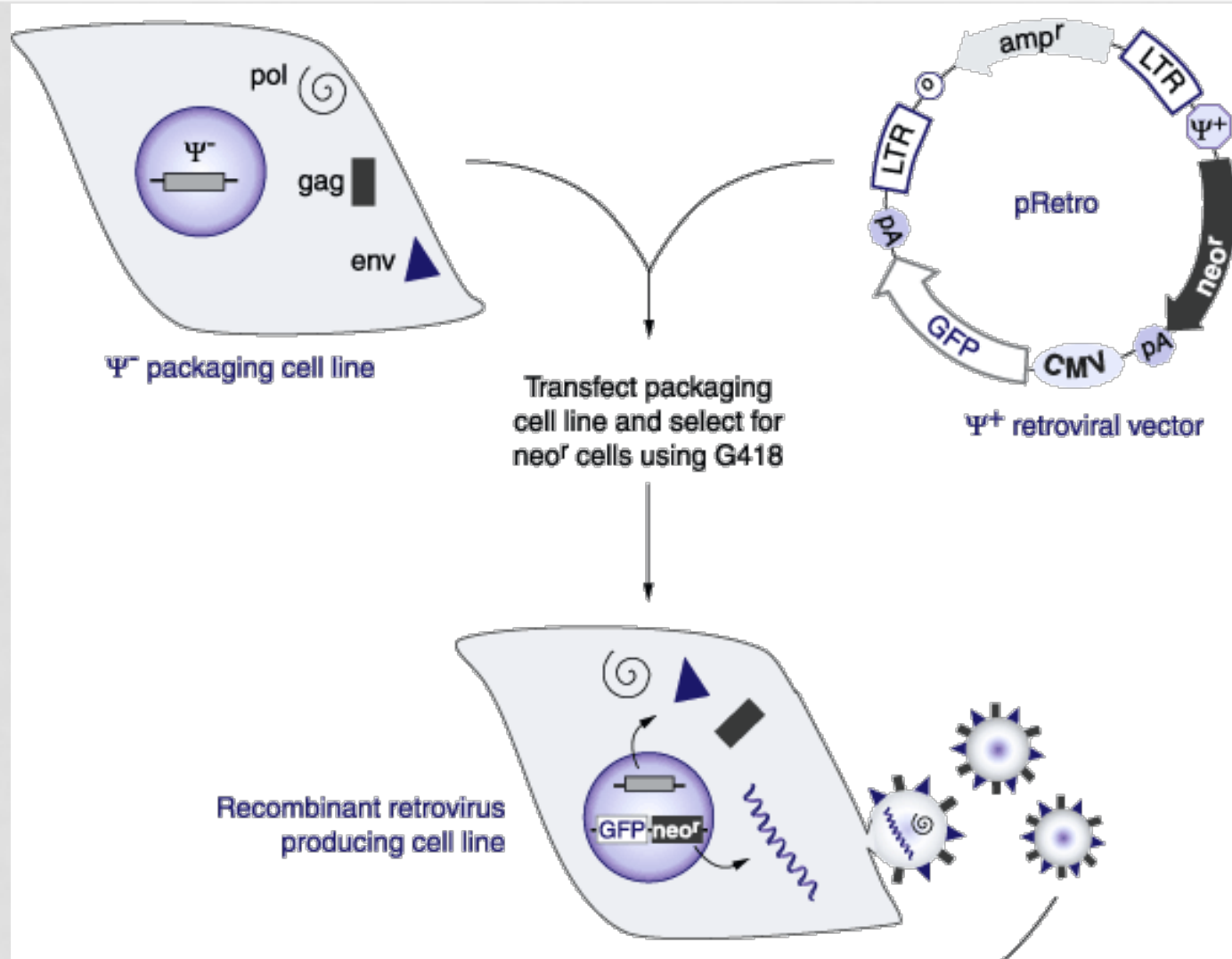
TIPOS DE VETORES VIRAIS PARA TERAPIA GÊNICA

Vector	Genetic material	Main limitations	Main advantages
<i>Enveloped</i>			
Retrovirus	RNA	Only transduces dividing cells; integration might induce oncogenesis in some applications	Persistent gene transfer in dividing cells
Lentivirus	RNA	Integration might induce oncogenesis in some applications	Persistent gene transfer in most tissues
HSV-1	dsDNA	Inflammatory; transient transgene expression in cells other than neurons	Large packaging capacity; strong tropism for neurons
<i>Non-enveloped</i>			
AAV	ssDNA	Small packaging capacity	Non-inflammatory; non-pathogenic
Adenovirus	dsDNA	Capsid mediates a potent inflammatory response	Extremely efficient transduction of most tissues

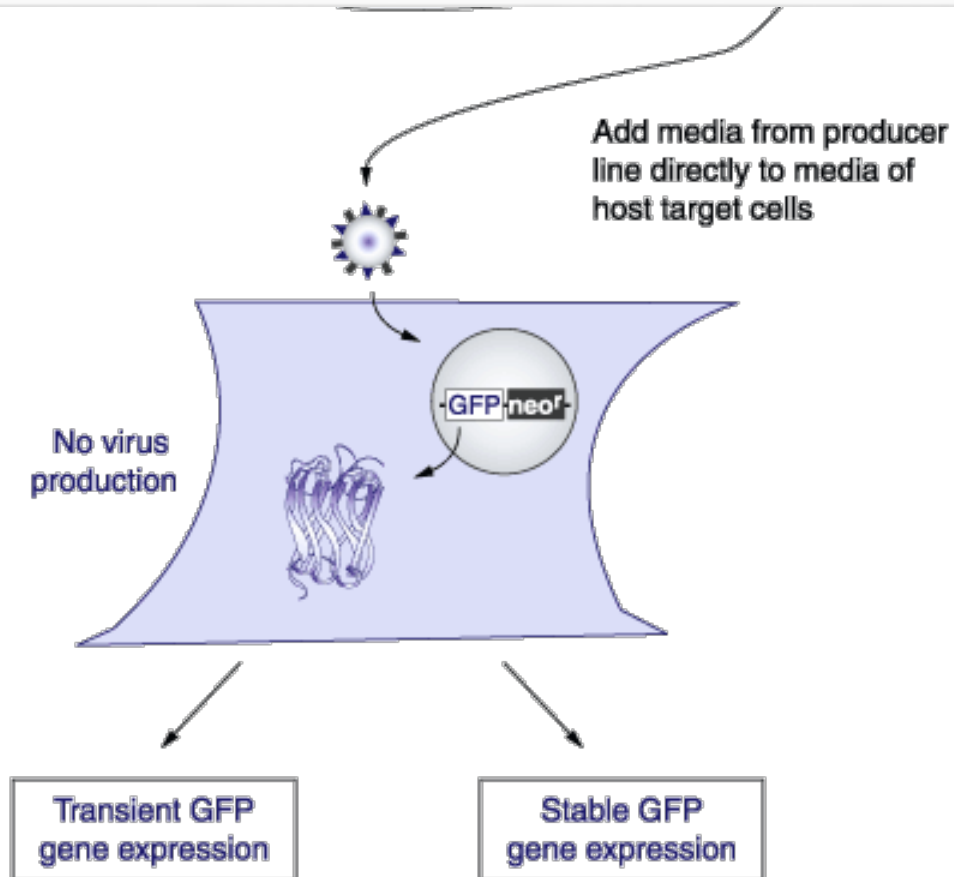
VETORES RETROVIRAIS



MÉTODOS DE EMPACOTAMENTO RETROVIRAL

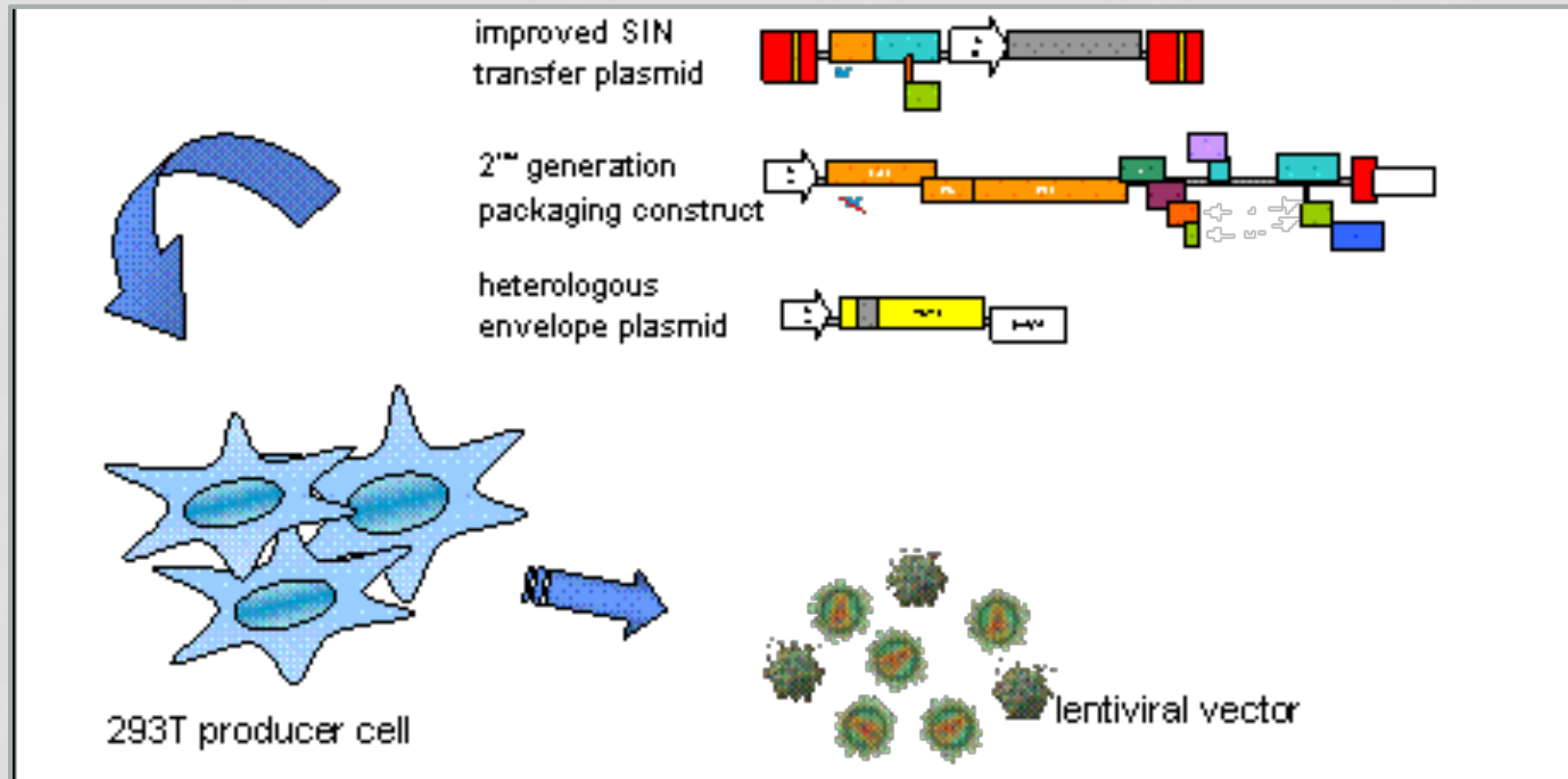


MÉTODOS DE EMPACOTAMENTO RETROVIRAL

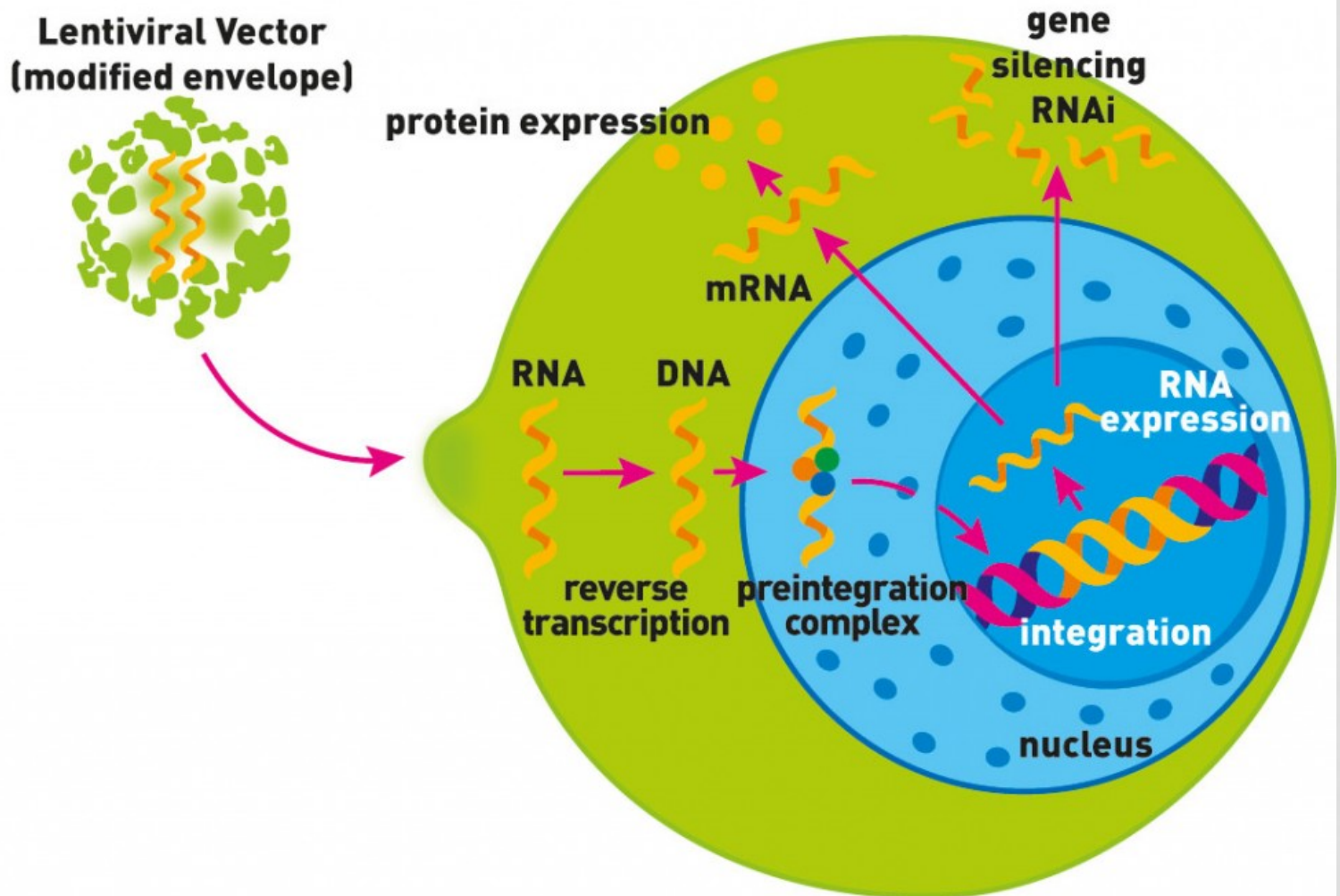


MÉTODOS DE EMPACOTAMENTO LENTIVIRAL

Produção de vetores lentivirais por meio da transfecção transiente tripla



INTEGRAÇÃO DO GENE DE INTERESSE NA CÉLULA ALVO



PRIMEIRO ENSAIO CLÍNICO DE TERAPIA GÊNICA

**Terapia gênica para deficiência de adenosina deaminase (ADA) –
Setembro 1990**



**The ADA Human Gene Therapy
Clinical Protocol**

**HUMAN GENE THERAPY 1:331–362 (1990)
Mary Ann Liebert, Inc., Publishers**

A cada 2 meses linfócitos T da criança eram coletados e inserido o gene ADA.



Linfócitos T/ADA+ eram expandidos no laboratório.



Re-infusão na criança.

PRIMEIRO ENSAIO CLÍNICO DE TERAPIA GÊNICA



R. Michael Blaese, MD with Ashanthi DeSilva (left) and Cindy Kisik at the IDF 2013 National Conference, June 29.

Foram realizadas 7 infusões.

Depois disso, as crianças voltaram a receber terapia de reposição embora em menor dose.

12 anos após o término das infusões, os dois casos foram re-avaliados. Na primeira paciente o número de linfócitos T que ainda expressavam o gene ADA era maior do que na segunda paciente.

PRIMEIRO ENSAIO CLÍNICO DE TERAPIA GÊNICA

Lymphocyte Gene Therapy

KENNETH W. CULVER, W. FRENCH ANDERSON, and R. MICHAEL BLAESE

HUMAN GENE THERAPY 2:107-109 (1991)

Mary Ann Liebert, Inc., Publishers

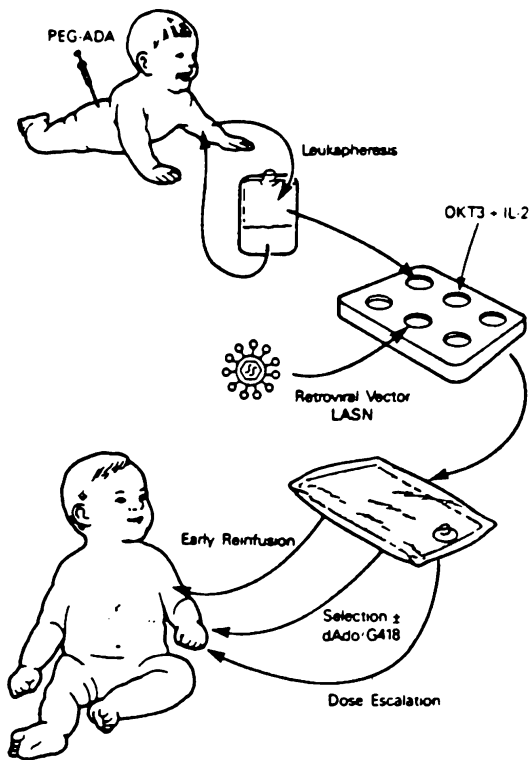
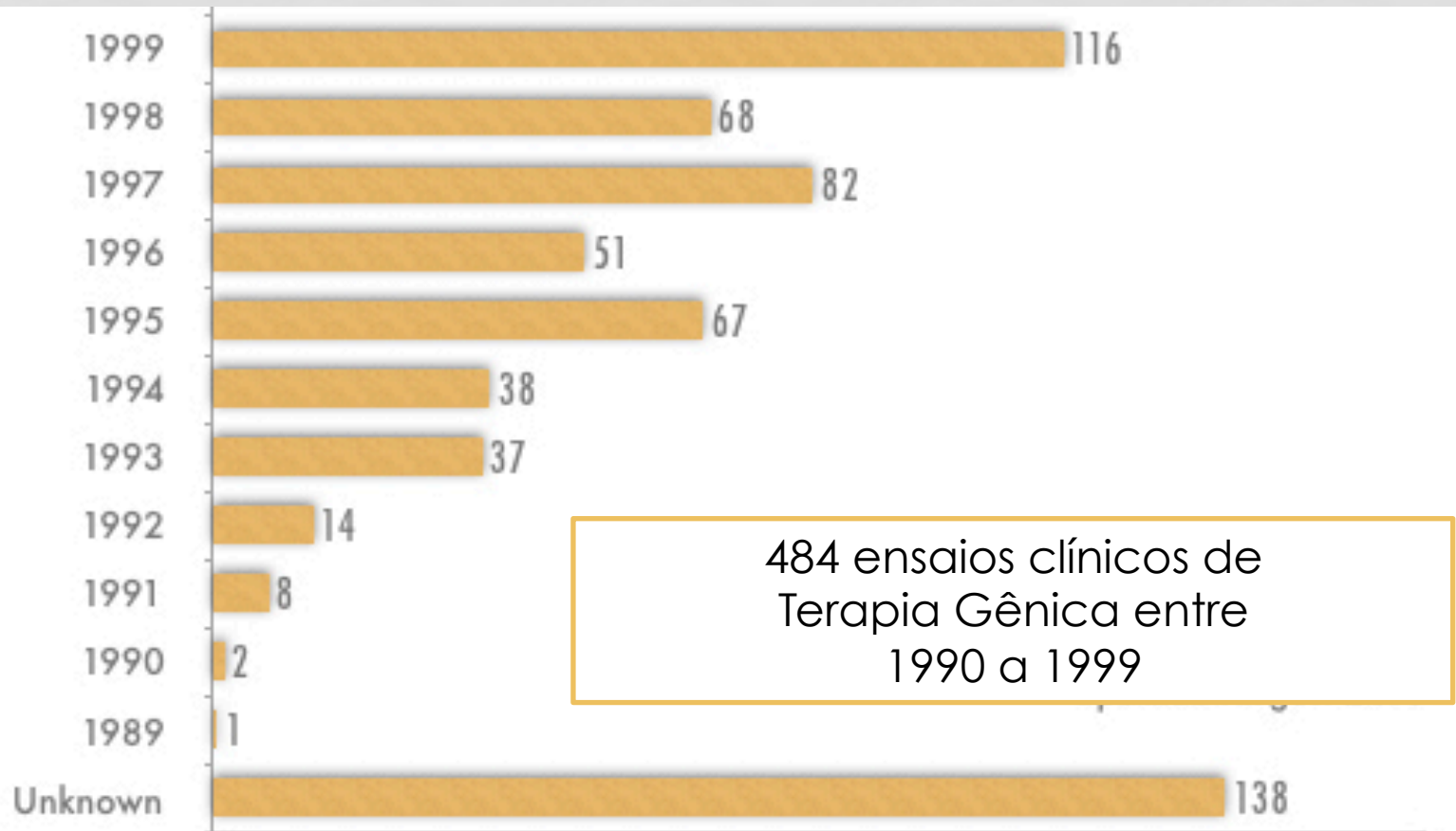


TABLE 1. RECOVERY OF ADA GENE-TRANSDUCED T CELLS FROM A SCID PATIENT

<i>Cell population tested</i>	<i>ADA concentration (units)</i>
Pretreatment PBL	1.3 ^a
PBL 3 weeks after second infusion	3.0
T cells cultured 3 weeks	43.3
Normal PBL	40-90

^a ADA enzymatic activity is expressed as nmol/min · 10⁸ cells.

DÉCADA DE 90 FORAM REALIZADOS ENSAIOS DE TERAPIA GÊNICA PARA VARIAS DOENÇAS GENÉTICAS



1999 – O MAIOR OBSTÁCULO PARA TERAPIA GÊNICA

1999 – Jesse Gelsinger – 18 anos afetado com uma doença metabólica conhecida como ornitina transcarbamylase faleceu durante o protocolo de terapia gênica na Philadelphia depois da administração do vetor adenoviral no fígado.

Gelsinger recebeu elevadas doses do vetor viral (3.8×10^{13} partículas) e desenvolveu febre muito alta após 4 horas.

Dia seguinte: sintomas de lesão hepática e coagulação vascular disseminada.

Após 4 dias: Gelsinger faleceu por falência múltipla dos órgãos.

Resultado da autópsia mostrou que embora o vetor foi infundido diretamente no fígado via a artéria hepática, quantidades substanciais foram disseminadas para circulação e induziu a resposta inflamatória que evoluiu para o quadro clínico observado.

2002 - 2003 – VETOR RETROVIRAL PODE INDUZIR DOENÇA LINFOPROLIFERATIVA

Em 2000, no hospital em Paris três crianças afetadas com a doença ligada ao cromossomo X conhecida como SCI-XI desenvolveram sistema imunológico funcional após a infusão de células hematopoéticas transduzidas com vetor retroviral que codifica a cadeia gama do receptor de citocina.

Após 2-3 anos, duas dessas crianças desenvolveram leucemia de células T provavelmente devido a inserção do vetor retroviral próximo ou dentro do oncogene LMO2 ativando sua expressão.

2008 – RETORNO DA TERAPIA GÊNICA

2008 - Amaurose Congênita de Leber: 3 pacientes (17 a 23 anos) receberam infusão do vírus adeno-associado 2/2.hRPE65p.hREP65

Effect of Gene Therapy on Visual Function
in Leber's Congenital Amaurosis

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

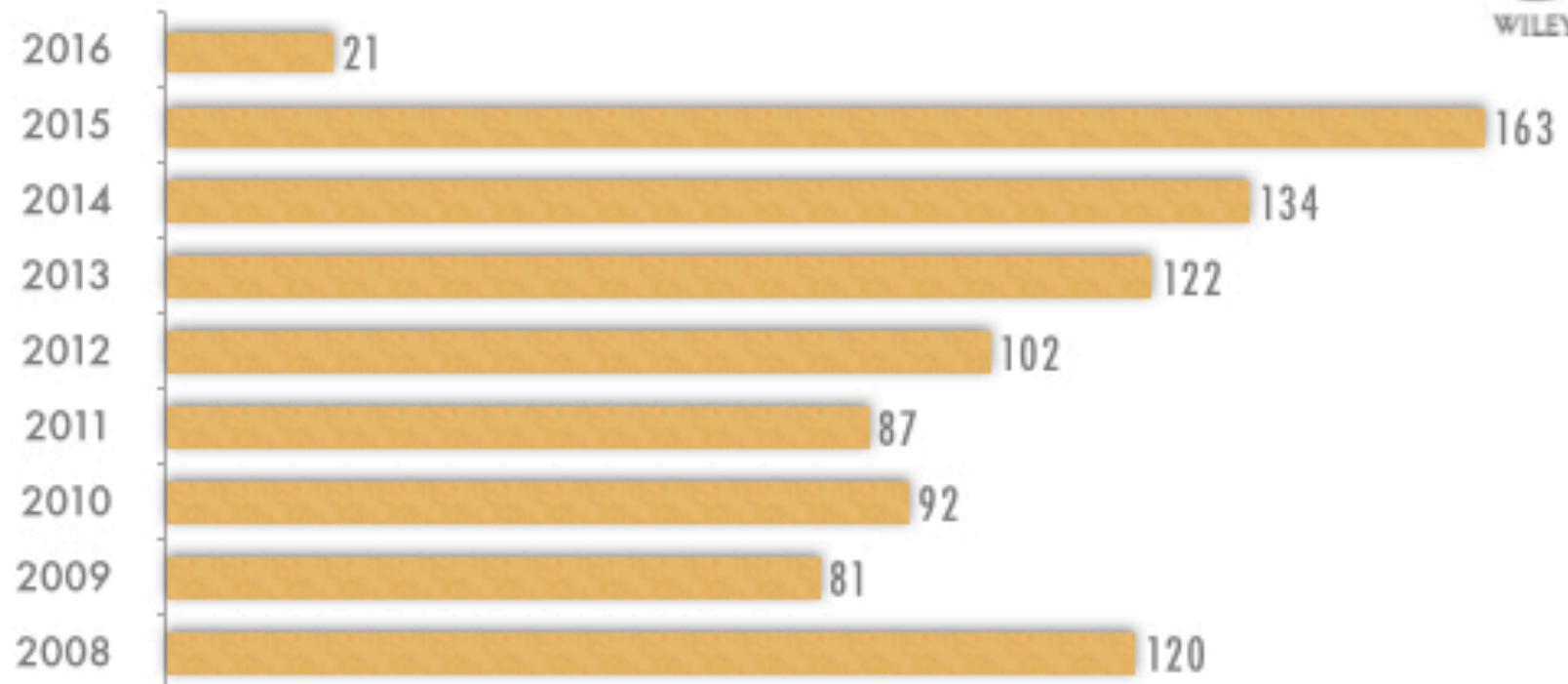


Não ocorreram efeitos adversos.

Um dos pacientes teve uma melhora na função visual.

Atualmente 4 países estão desenvolvendo esse tipo de terapia gênica: Itália, França, USA e UK.

NÚMERO DE ENSAIOS CLÍNICOS DE 2008 A 2016



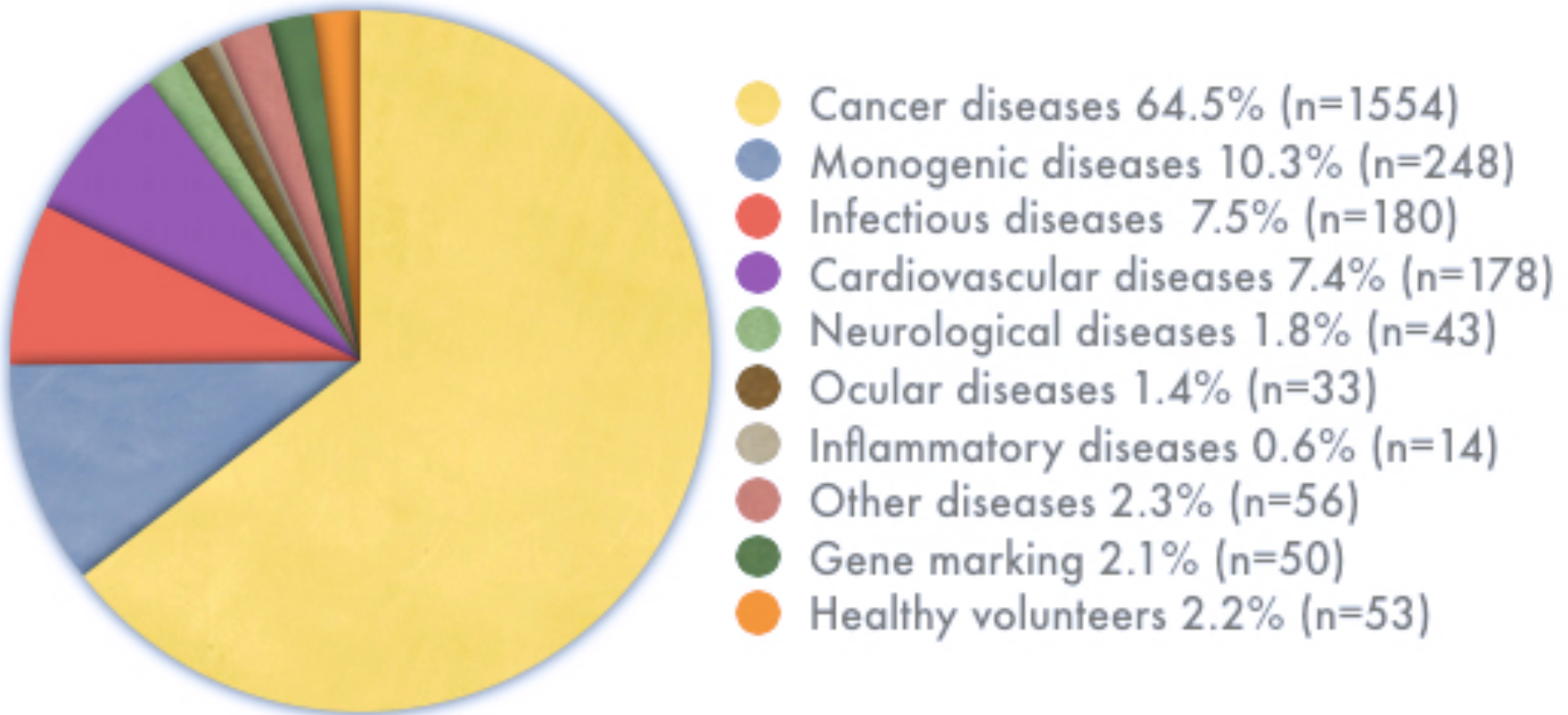
NÚMERO DE ENSAIOS CLÍNICOS DE 1989 A 2016 – TIPO DE GENE (TOTAL = 2409)

Gene type	Gene Therapy Clinical Trials	
	Number	%
Adhesion molecule	12	0.5
Antigen	466	19.3
Antisense	17	0.7
Cell cycle	10	0.4
Cell protection/Drug resistance	20	0.8
Cytokine	377	15.6
Deficiency	200	8.3
Growth factor	172	7.1
Hormone	9	0.4
Marker	55	2.3
Oncogene regulator	12	0.5
Oncolytic virus	75	3.1

NÚMERO DE ENSAIOS CLÍNICOS DE 1989 A 2016 – TIPO DE GENE (TOTAL = 2409)

Porins, ion channels, transporters	23	1
Receptor	250	10.4
Replication inhibitor	92	3.8
Ribozyme	6	0.2
siRNA	11	0.5
Suicide	171	7.1
Transcription factor	35	1.5
Tumor suppressor	191	7.9
Others	149	6.2
Unknown	56	2.3
Total	2409	

NÚMERO DE ENSAIOS CLÍNICOS DE 1989 A 2016 - TIPO DE DOENÇA (TOTAL = 2409)



FASES DE UM PROJETO DE TERAPIA GÊNICA COM SISTEMA LENTIVIRAL

- **Clonagem do Gene no vetor de escolha (sistema gateway) – 2 meses**
- **Geração de uma linhagem celular com produção transiente do gene terapêutico – 2 meses**
- **Produção de Virus e cálculo do título viral – 1 mes**
- **Geração e caracterização da linhagem celular com produção permanente do gene de interesse – 4 meses**
- **Obtenção e armazenamento de um clone celular com altos níveis de produção da proteína terapêutica – 3 meses.**

QUESTÕES

- ☐ Como realizada hoje, a terapia gênica leva a correção do defeito genético? Explique
- ☐ Quais os principais parâmetros a serem analisados para obtenção do sucesso da terapia gênica?
- ☐ Imagine que você gostaria de desenvolver um protocolo clínico para tratamento de Hemofilia A. Elabore a estratégia para o uso de um gene codificador de proteína e uma estratégia para o uso de um gene não codificador de proteína.
- ☐ Construa o mapa conceitual sobre terapia gênica.