

# Definice genového inženýrství

Genové inženýrství se zabývá vytvářením pozměněných či nových genů nebo přípravou nových (nepřirozených) kombinací genů a jejich zaváděním do genomu organismů s cílem rekonstruovat jejich genetickou výbavu a vytvářet tak geneticky modifikované (transgenní) organismy.

Metodickým základem genového inženýrství jsou manipulace s DNA *in vitro* (klonování genů a jejich úpravy).

Pozn.: cílené změny genetické informace lze provádět také *in vivo*

Genové manipulace, moderní (molekulární) biotechnologie

# KLONOVÁNÍ

Genů (DNA)

Buněk nebo organismů

Vytváření identických kopií genu určitého organismu v buňkách jiných organismů

Vytváření identických kopií buněk nebo organismů nepohlavní cestou

**Genové inženýrství**  
(moderní biotechnologie)

- Vytváření transgenních organismů
- Příprava látek v nepříbuzných organismech
- Vytváření nových látek
- Genové terapie

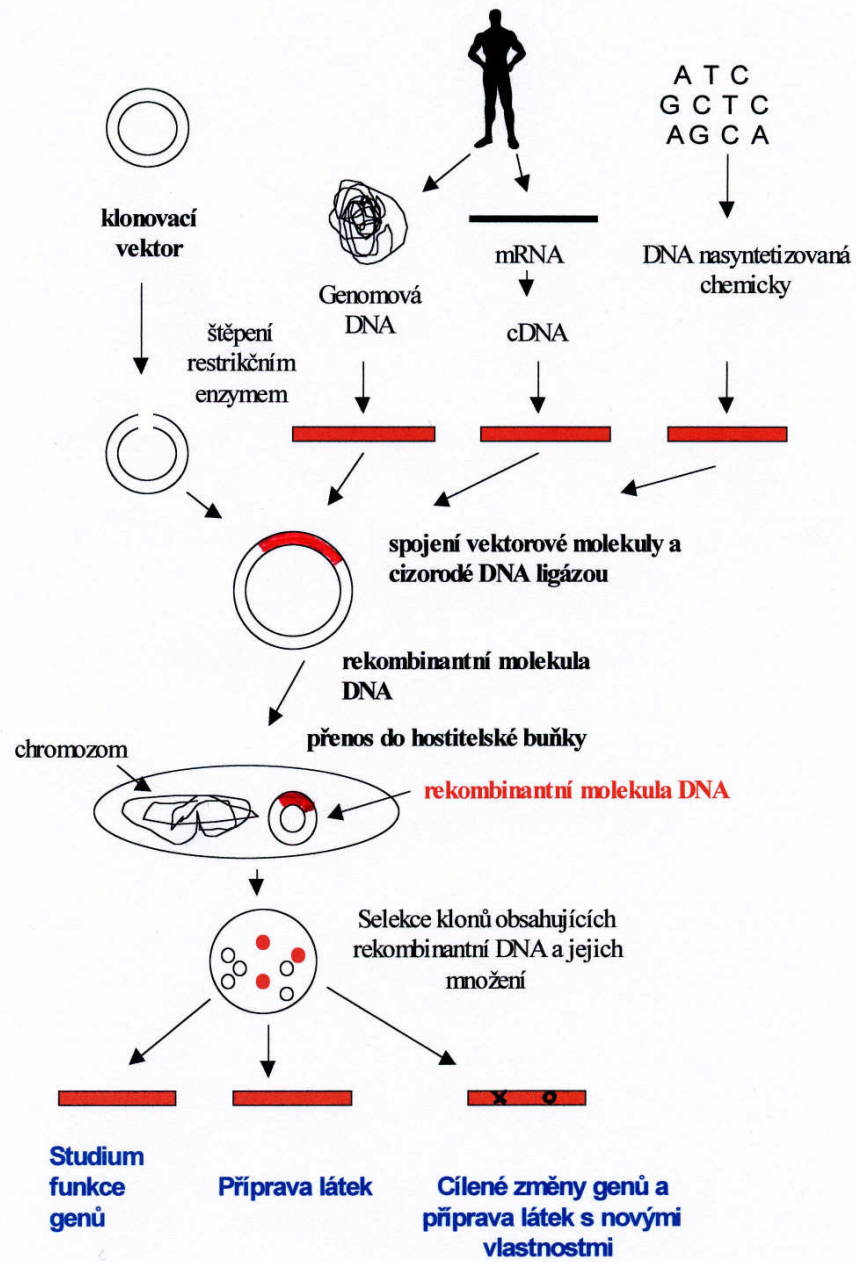
**Reprodukční klonování**

Vytváření identických jedinců (klonů)  
Ovce Dolly

**Terapeutické klonování**

Pomonožování kmenových embryonálních buněk pro léčebné účely

# Klonování genů



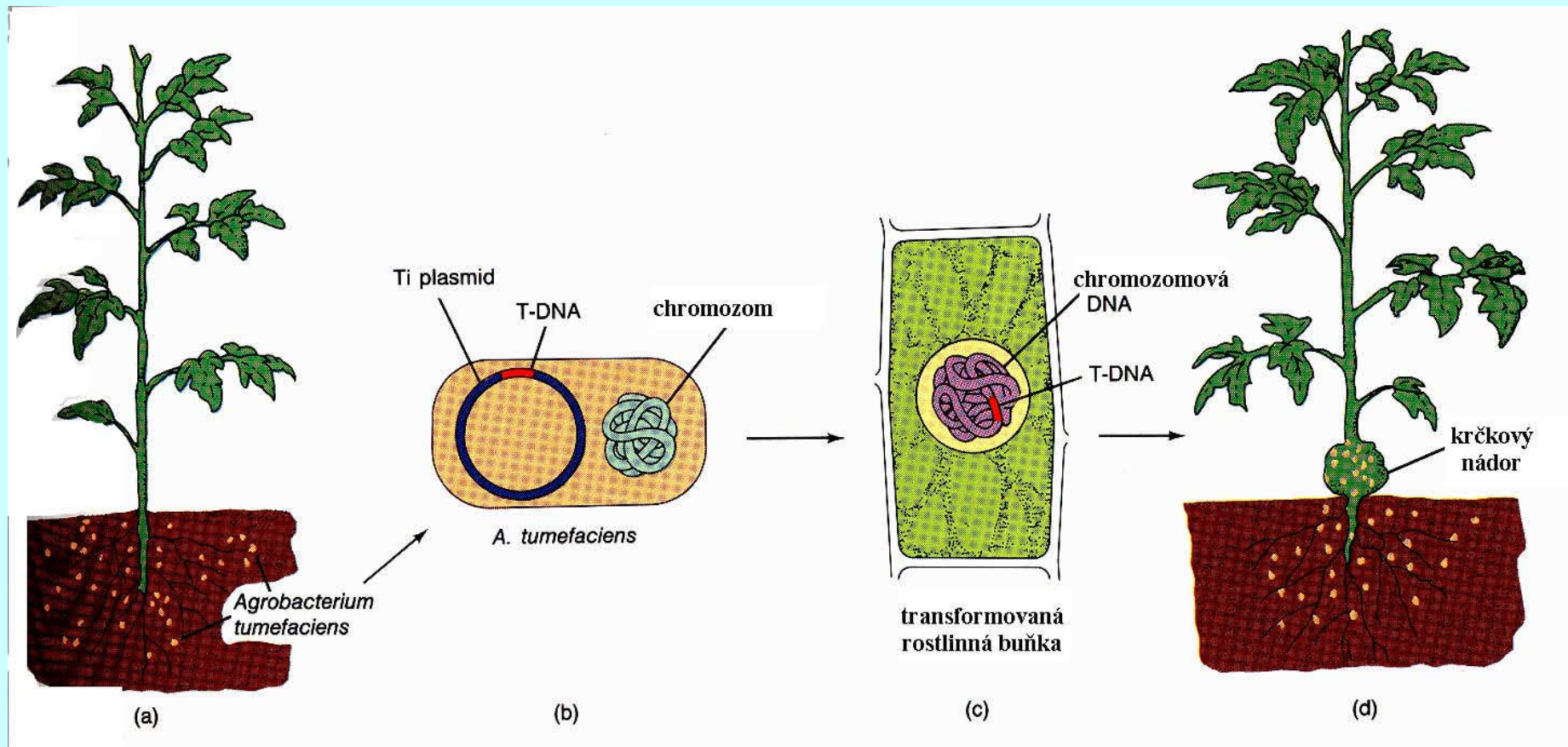
# Využití genového inženýrství

Ve výzkumu: studium struktury, funkce a exprese genů (genomů)

Praktické využití (moderní biotechnologie):

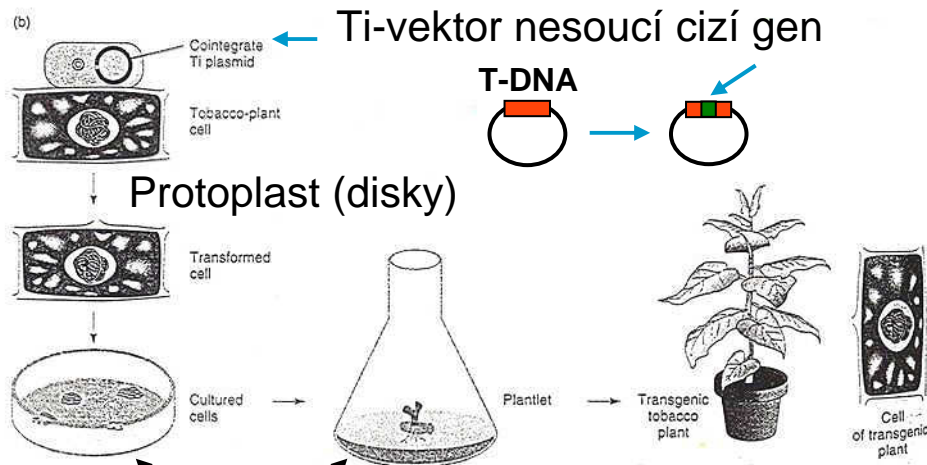
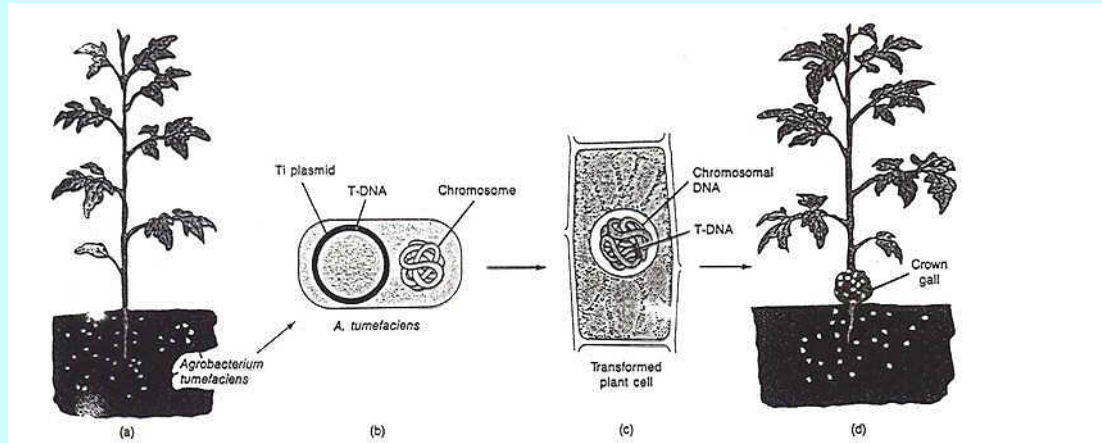
1. Příprava látek významných v lékařství, zemědělství a průmyslu
  - vnášení cizorodých genů do nepříbuzných organismů a získávání produktů ve velkém množství – *překonání reprodukčních bariér*
2. Příprava látek s novými vlastnostmi pozměňováním stávajících genů nebo vytvářením nových genů – *enzymy, protilátky, vakcíny aj.*
3. Pozměňování a zlepšování vlastností organismů - vytváření geneticky modifikovaných n. transgenních organismů (GMO)
  - *příprava mikroorganismů pro biotechnologie,*
  - *zvyšování výnosů kulturních rostlin a užitkovosti hosp. zvířat (odolnost vůči chorobám, škůdcům nebo zevním vlivům, produkce cizích látek v tělech rostlin a zvířat)*
  - genové terapie

## Transformace rostlinných pletiv Ti-plazmidem





# Přenos cizích genů do rostlin pomocí Ti-plazmidu



← Ti-vektor nesoucí cizí gen

Živné medium  
s růstovými faktory

Transgenní  
rostlina  
přenášející  
geny do  
potomstva

# VYUŽITÍ TRANSGENNÍCH ROSTLIN

## 1. Ovlivňování agronomických vlastností

- rezistence k patogenům (hmyzu, virům, plísním apod)
- rezistence k herbicidům
- tolerance ke stresům (suchu, mrazu, zasolení půd)

## 2. Modifikace užitečných vlastností

- prodloužení skladovatelnosti zpomalením zrání
- rezistence k skládkovým chorobám
- vylepšování nutriční hodnoty a chuti
- produkce sekundárních metabolitů
- produkce farmakologicky účinných látek (vitamíny, vakcíny)

### Technické plodiny

- produkce modifikovaných olejů pro průmyslové využití
- produkce biodegradovatelných plastů
- produkce bionafty

## 3. Využití pro bioremediace (čištění prostředí)

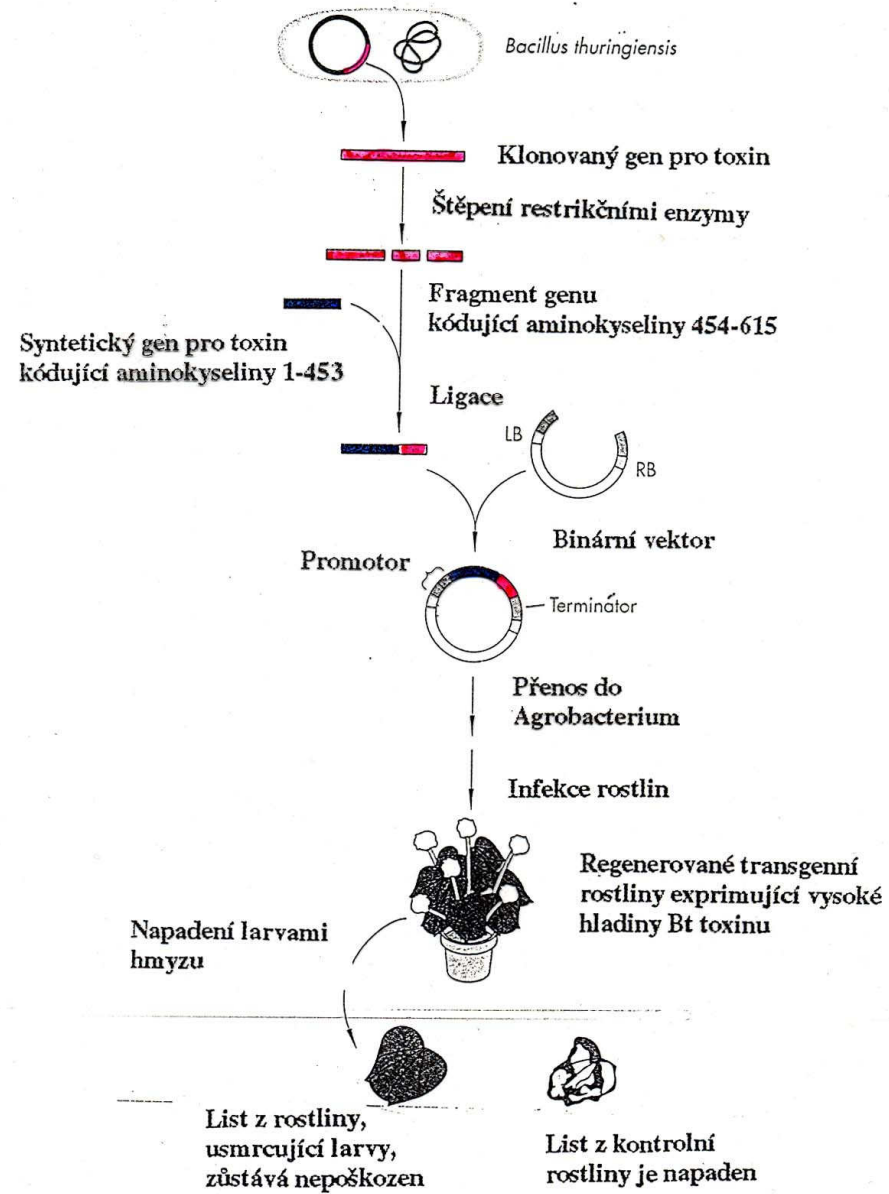
# Transgenní BT-kukuřice

Obsahuje navíc tři geny:

- 1.** Gen podmiňující odolnost rostlin proti hmyzím škůdcům (bakteriální gen z *Bacillus thuringiensis* zodpovědný za tvorbu deltatoxinu, který je jedovatý pro některé skupiny hmyzu, ale zcela neškodný pro savce a člověka)
- 2.** Gen pro odolnost vůči herbicidu Basta (jeden z nových herbicidů, který má krátkou životnost a je šetrný k prostředí). Gen pochází z bakterie *Streptomyces*.
- 3.** Gen pro odolnost k antibiotiku ampicilinu (selekční marker použitý pro selekci transgenních rostlin (buněk) při jejich přípravě). Gen pochází z bakterie.



## Rostliny rezistentní k hmyzím škůdcům



**Toxiny z různých kmenů *B. thuringiensis* působí na různé hmyzí druhy**

<i>B. thuringiensis</i> (kmen)	Protoxin (kDa)	Cílový hmyz (rod)	Serotyp toxinu
berliner	130-140	Lepidoptera	1
kurstaki KTO, HD-1	130-140	Lepidoptera	3
entomocidus 6.01	130-140	Lepidoptera	6
aizawai 7.29	130-140	Lepidoptera	7
aizawai IC 1	135	Lepidoptera, Diptera	7
kurstaki HD-1	71	Lepidoptera, Diptera	3
tenebrionis (san diego)	66-73	Coleoptera	8
morrisoni PG14	125-145	Diptera	8
israelensis	68	Diptera	14

BT-toxiny ~ Cry proteiny – parasporální krystaly

**Zavíječ kukuřičný je jedním z nejvýznamnějších škůdců kukuřice, který snižuje výnosy a kvalitu zrna, navíc také roznáší houbovité nemoci. Zároveň také zvyšuje lámavost stébel, což znamená sklizňové ztráty**



**normální a transgenní kukuřice**

## Některé transgenní rostliny obsahující gen kódující plášťový protein patogenního viru, který zajišťuje odolnost rostlin vůči virové infekci

### Zdroj plášťového proteinu

### Transgenní rostlina

Alfalfa mosaic virus	Alfalfa, tobacco, tomato
Arabis mosaic virus	Tobacco
Beet necrotic yellow vein virus	Sugar beet
Cucumber mosaic virus	Cucumber, tobacco
Cymbidium ringspot virus	Tobacco
Grapevine chrome mosaic virus	Tobacco
Maize dwarf mosaic virus	Sweet corn
Papaya ringspot virus	Papaya, tobacco
Plum pox virus	Tobacco
Potato aucuba mosaic virus	Tobacco
Potato leaf-roll virus	Potato
Potato virus S	Potato
Potato virus X	Potato, tobacco
Potato virus Y	Potato, tobacco
Rice stripe virus	Rice
Soybean mosaic virus	Tobacco
Tobacco etch virus	Tobacco
Tobacco mosaic virus	Tobacco, tomato
Tomato mosaic virus	Tomato
Tomato rattle virus	Tobacco
Tomato streak virus	Tobacco
Tomato spotted wilt virus	Tobacco
Watermelon mosaic virus II	Tobacco
Zucchini yellow mosaic virus	Muskmelon, tobacco

## Příklady terapeuticky využitelných látek připravovaných v rostlinách

Protein	Rostlina	Využití
Human protein C	Tobacco	Anticoagulant
Human hirudin variant 2	Tobacco, canola, Ethiopian mustard	Anticoagulant
Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Tobacco	Neutropenia
Human erythropoietin	Tobacco	Anemia
Human enkephalins	Thale cress, canola	Antihyperanalgesic by opiate activity
Human epidermal growth factor	Tobacco	Wound repair/control of cell proliferation
Human $\alpha$ -interferon	Rice, turnip	Hepatitis C and B
Human serum albumin	Potato, tobacco	Liver cirrhosis
Human hemoglobin	Tobacco	Blood substitute
Human homotrimeric collagen I	Tobacco	Collagen synthesis
Human $\alpha$ 1-antitrypsin	Rice	Cystic fibrosis, liver disease, hemorrhage
Human growth hormone	Tobacco	Dwarfism, wound healing
Human aprotinin	Corn	Trypsin inhibitor for transplantation surgery
Angiotensin-1-converting enzyme	Tobacco, tomato	Hypertension
$\alpha$ -Tricosanthin	Tobacco	HIV therapy
Glucocerebrosidase	Tobacco	Gaucher disease



Normální a zlatá rýže obsahující betakaroten





**Transgenní rýže obsahující zhruba 5x vyšší koncentraci Fe v endospermu což je úroveň požadovaná pro dostatečnou výživu z hlediska železa.**



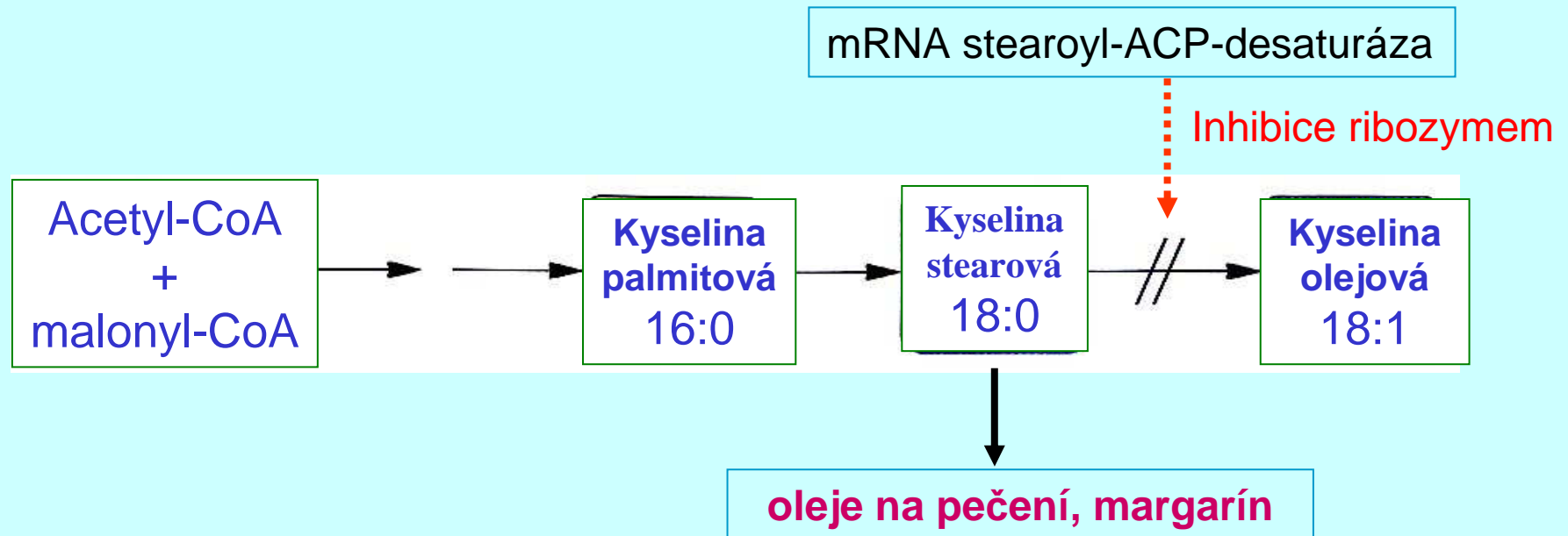
**Geneticky modifikovaný tabák (vlevo) odolný vůči suchu**



**Geneticky modifikovaný huseníček Thalův (*Arabidopsis thaliana*), který mění barvu listů v přítomnosti oxidu dusičitého. Ten se uvolňuje z náloží v zakopaných nášlapových minách a proniká do půdy. V geneticky modifikované rostlině se v přítomnosti tohoto plynu indukuje syntéza antokyanů, jimiž se barví její listy na podzim. V geneticky modifikovaném huseníčku tedy není produkována látka, která by byla rostlině cizí a už vůbec se nemusíme bát, že by mohlo jít o nějaký toxin. Pokud by bylo minové pole oseto geneticky modifikovaným huseníčkem nebo jinou podobně modifikovanou rostlinou, pak by trsy barevně pozměněných rostlin prozradily, kde se miny skrývají. Huseníček by miny odhalil už za tři až šest týdnů od vysetí.**

# Cílené změny exprese mRNA

Modifikace biosyntetické dráhy mastných kyselin u kukuřice



## Inhibice exprese mRNA:

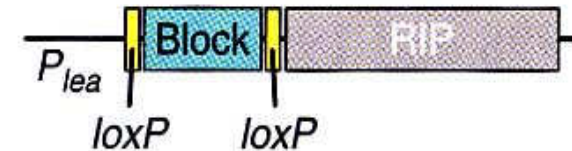
1. Dodání přídatné kopie genu (kosuprese)
2. Vložení antisense-verze genu
3. Použití ribozymů se sekvenčně-specifickou endoribonukleázovou aktivitou

# Terminátorová technologie pro přípravu sterilních semen

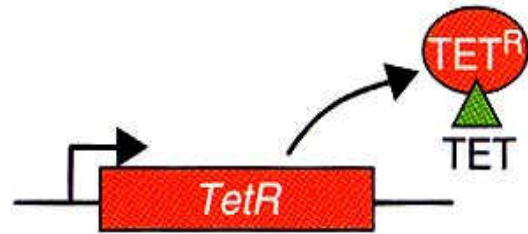
- Tetracycline (producer)



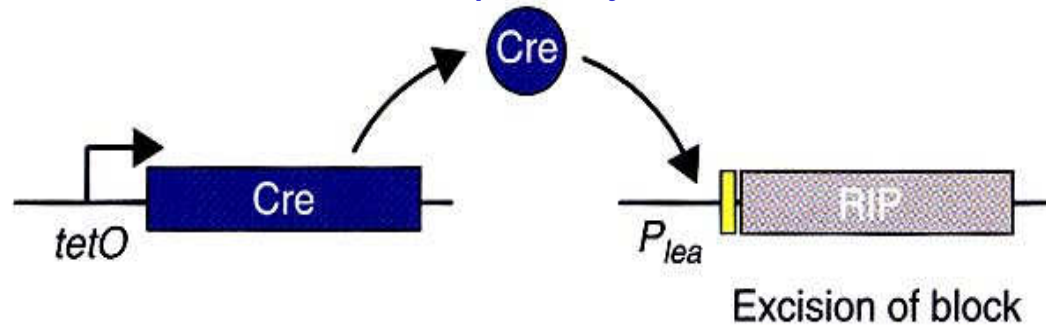
Bez aplikace tetracyklinu lze získávat klíčivá semena a rostliny opakovaně pěstovat



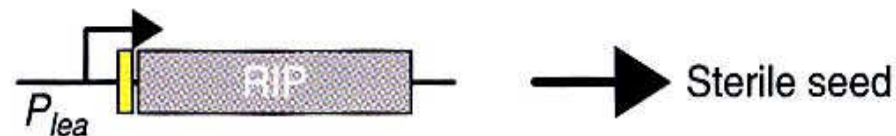
+ Tetracycline (soak seeds before sale)



- před prodejem prodejce aplikuje tetracyklin na semena a prodá je farmářům

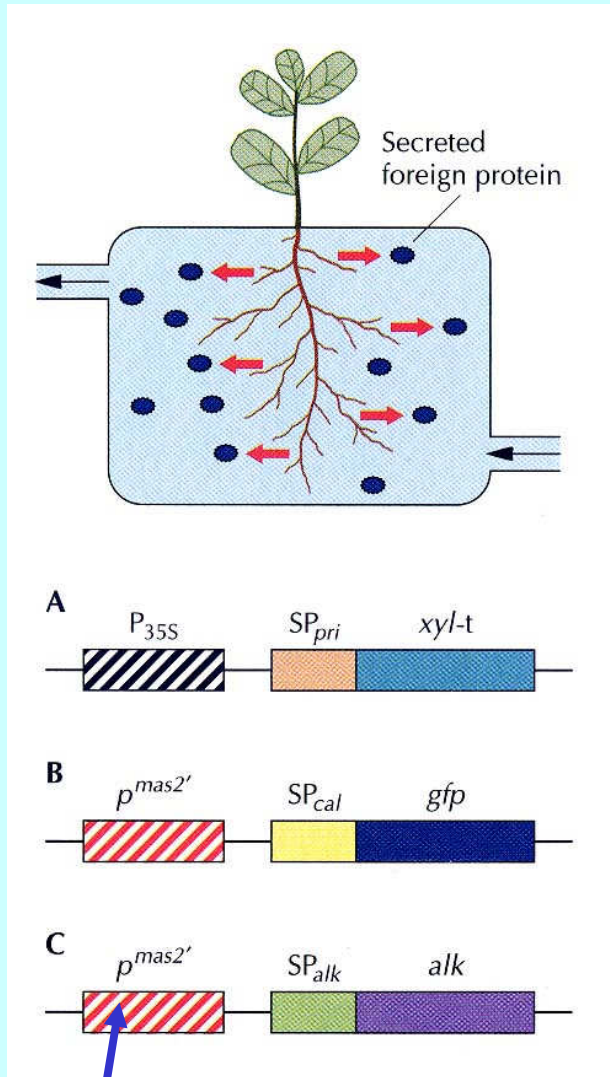


- Tetracycline (farmer)



Farmář vypěstuje ze semen rostliny, ale semena těchto rostlin jsou sterilní

# Dosažení sekrece proteinů kořeny rostlin



$P^{mas2'}$  = mannopin-syntáza

„Rhizosekrece“ – Hydroponická kultura transgenní rostliny sekretující cizorodý protein do apoplastu buněk a následně do prostředí

Normálně sekretované: nízkomolekulární látky (aa + cukry) – kořenné exudáty (výživa bakterií)

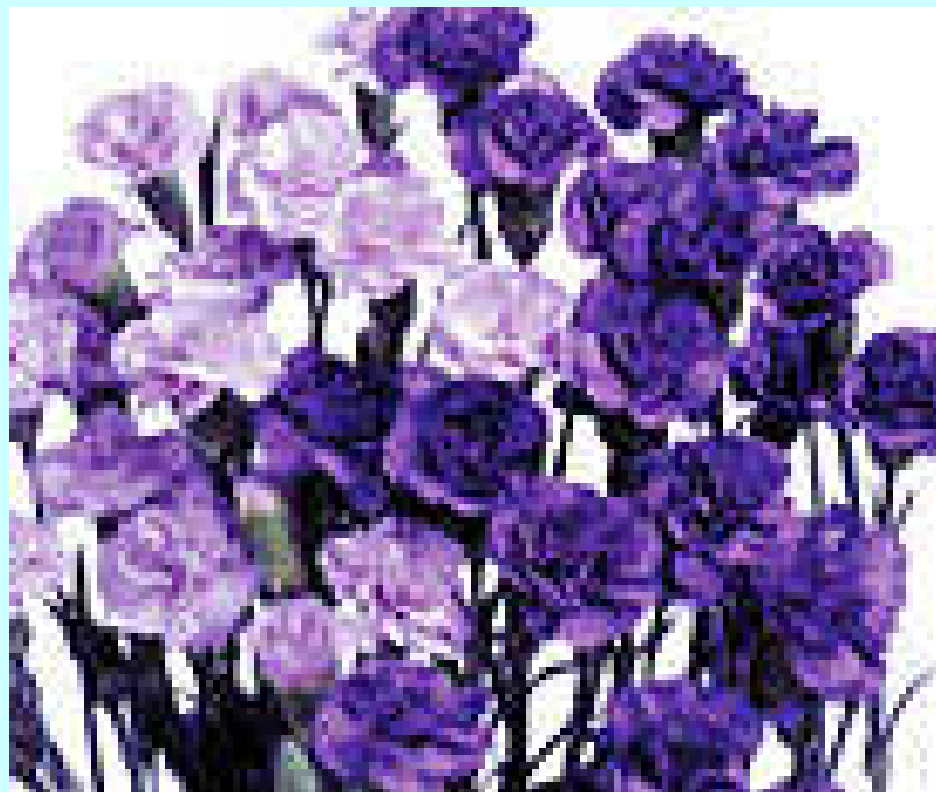
Experimentálně dosažená exkrece různých proteinů v kořenech rostlin

A, B. Signální peptid proteinázového inhibitoru tabáku

C. Signální peptid lidské alkalické fosfatázy

Listové exudáty (gutace)



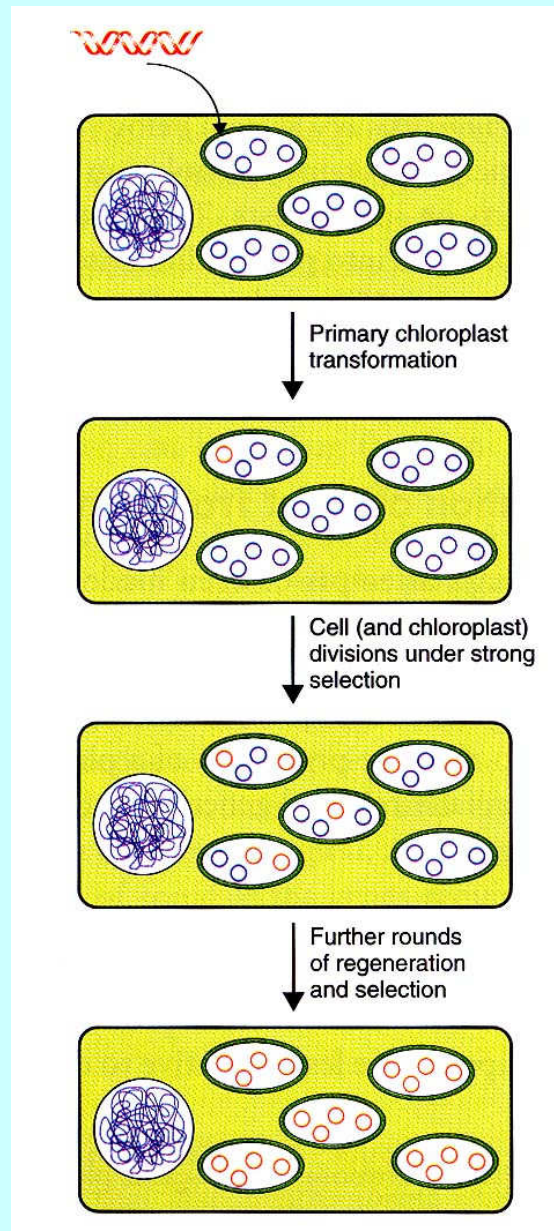


Geneticky modifikované modré karafiáty Moondust získané australskou firmou Florigen ve spolupráci s japonskou společností Suntory

# Transformace chloroplastů

- vlastní genom: dsDNA, 155 kb, 87.
- operonové uspořádání chloroplastových genů – možnost exprimovat více genů z jednoho transkriptu
- vysoce ploidní (více kopií genomu) – tisíce chloroplastů
- chloroplasty nejsou v pylu, transgen se nebude přenášet při křížení
- **inzerce DNA do chloroplastového genomu probíhá homologní rekombinací v přesném místě**
- chloroplastové geny jsou transkribovány chloroplastově specifickými promotory
- selekční marker (aadA) – rezistence k spektinomycinu
- selekční marker lze eliminovat pomocí cre-lox rekombinace.
- přenos DNA biolistickými metodami
- vytváření lidských terapeutických proteinů (lidský somatotropin)
- rezistence k hmyzu (toxin B. thuringiensis) – **není v pylu!**

# Selekce homogenně transgenních chloroplastů



Každá buňka obsahuje 50-100 chloroplastů, každý obsahuje 10-20 nukleoidů (nehistonových proteinů s omotanou DNA), z nich každý má 5-10 genomů. Jedna buňka tak může obsahovat více než 10 000 **plastidových** genomů

Homoplasmická buňka

## Transgenní rostliny

### A. Rezistence k virům

zavedení genu pro plášťový protein VTM do Ti-plazmidu, přenos do tabáku, rajčat

vakcína je multivalentní, působí na jiné virózy

### B. Rezistence k pesticidům

Vnesení genu pro endotoxin z *Bac. thuringiensis* působícího na hmyzí škůdce (BT-rostliny: kukuřice, tabák, brambor, aj)

Nepřímý způsob - naklonování genu pro tvorbu toxinu do bakterií kolonizujících rostliny (listy, kořeny) - např. *Pseudomonas fluorescens*.

### C. Rezistence k herbicidům.

Např. glyfozátu (nejpoužívanější neselektivní herbicid) inhibuje enzymy tvorby esenciálních aminokyselin.

1. Vnesení genu pro tvorbu cílového enzymu

(větší množství zajistí odolnost rostlin)

2. Vnesení genu pro tvorbu pozměněného (méně citlivého) enzymu

3. Vnesení genu pro tvorbu enzymu, který inaktivuje herbicid

### D. Vylepšení nutričních hodnot plodů a semen nebo rostlinných produktů využívaných průmyslově

\* rajče FlavrSavr fy Calgene - transgen: antisense mRNA genu pro polygalakturonidasu - prodloužená konzumní zralost

\* rýže - vhodná pro alergiky

\* řepka - olej ze semen obsahující zvýšený podíl kys. laurové (mýdla a detergenty),

\* řepka - olej ze semen bohatý na myristát (kosmetika), nebo kys. eruková (mazadla a výroba nylonu)

\* *Arabidopsis* a řepka - Tvorba biodegradovatelných polymerů v chloroplastech využitelných jako plasty (polyhydroxybutyrát, polymery podobné polyesteru ve vláknech bavlníku)

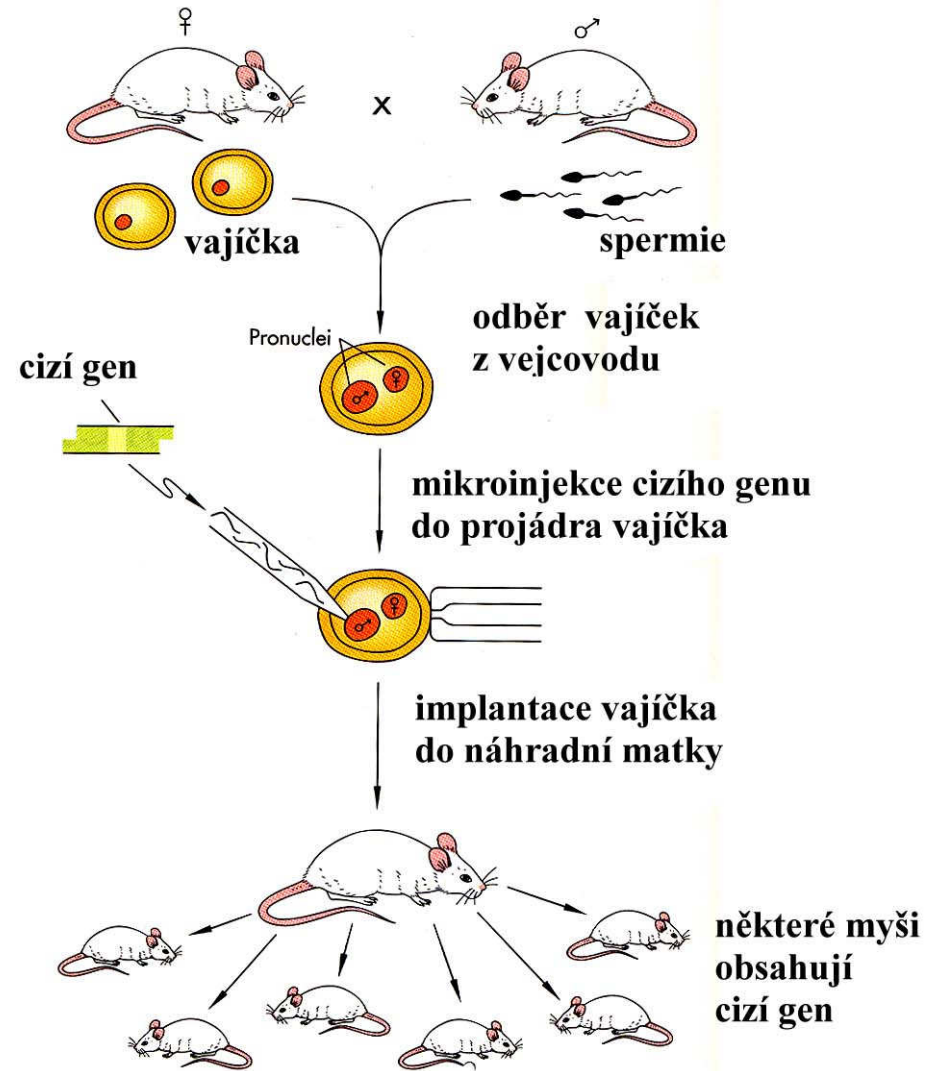
### E. Produkce vakcín rostlinami

Syrová zelenina obsahující antigen (vakcínu), který indukuje tvorbu imunoglobulinů mukózního imunitního systému v zažívacím traktu

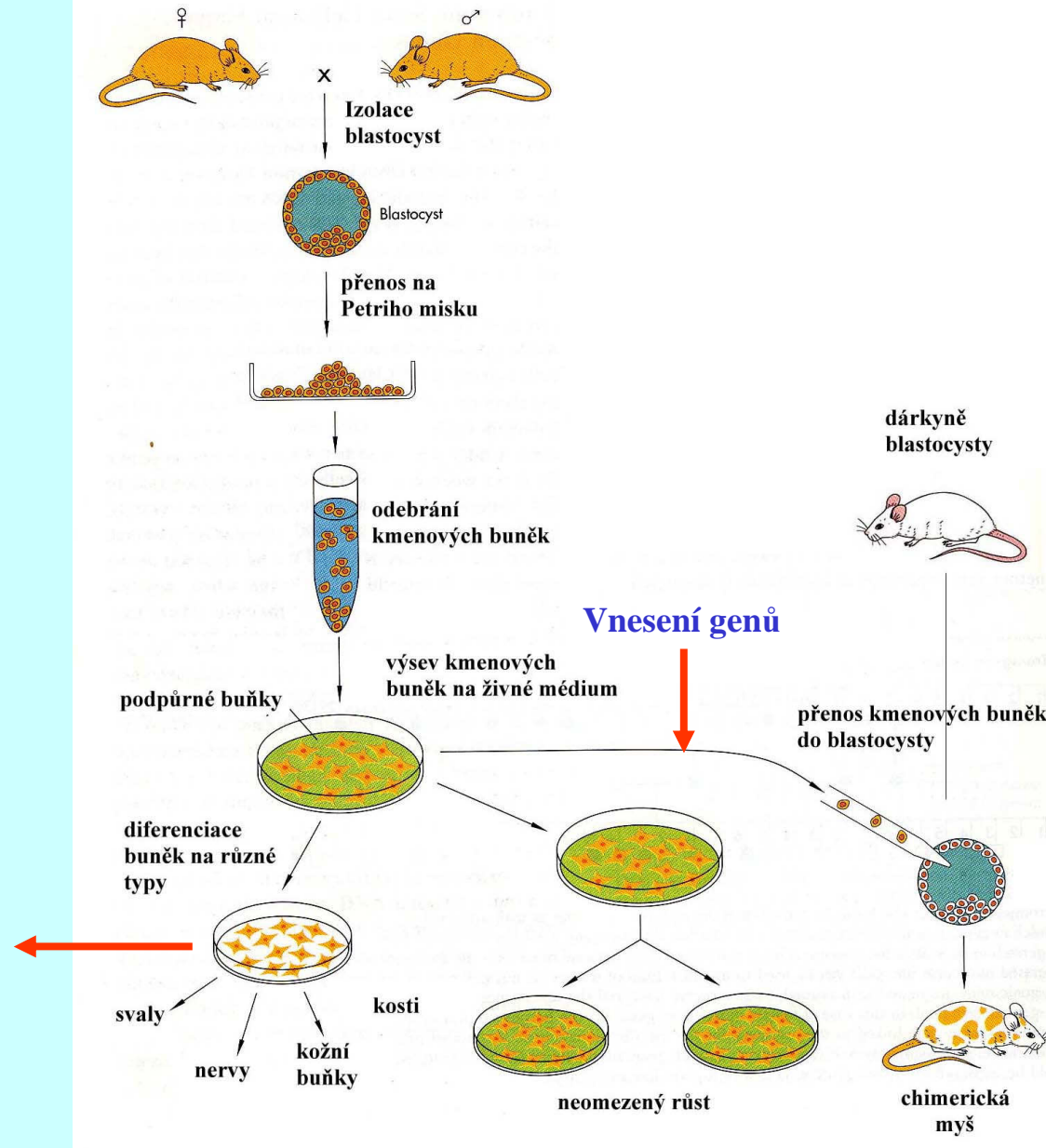
\* povrchový antigen viru hepatitidy B

\* podjednotka B toxinu cholery

## Vytváření transgenních myší mikroinjekcí cizího genu do oplozeného vajíčka



## Manipulace s embryonálními kmenovými buňkami

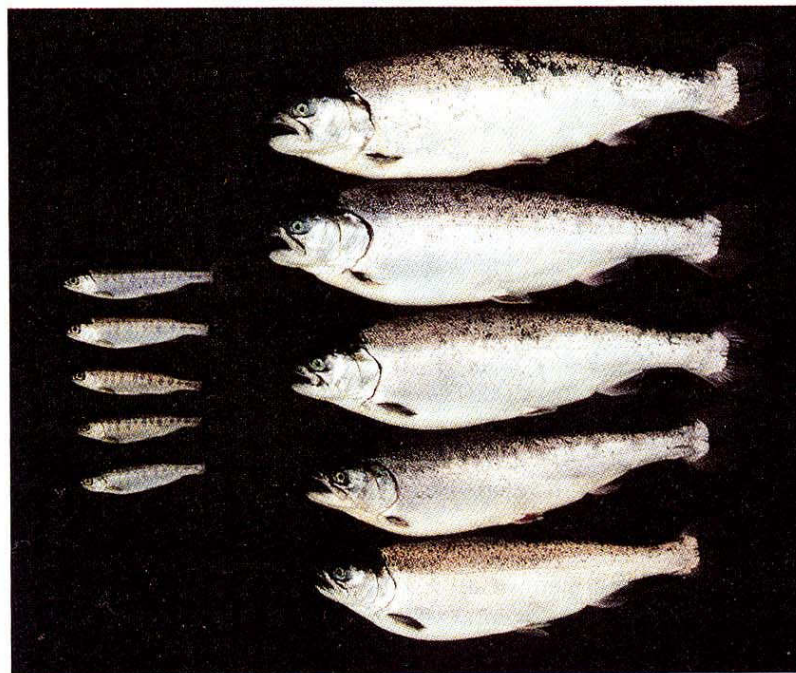


**Terapeutické klonování,  
náhrada tkání a orgánů**



## Příklady transgenních živočichů

- **Zvířata (myši, drůbež, hospodářská zvířata, ryby) obsahující gen pro růstový hormon – rychlejší růst, změna vlastností produktů**
- **Přežvýkavci obsahující ve střevě GMO-mikroorganismy, které redukují toxicitu některých rostlin (rozšíření potenciálu krmiv)**
- **Drůbež s pozměněnými trávicími schopnostmi (celulóza, lignin, tuky)**
- **Drůbež se zvýšeným obsahem lysozymu ve vejcích (využití v průmyslu a farmakologii)**
- **Ovce s vylepšenou srstí**
  
- **Myši s pozměněnými nebo inaktivovanými geny**
  - **studium lidských genetických poruch:**
  - **neurodegenerativní, imunitní, hormonální choroby,**
  - **vliv faktorů na organismus faktorů (např. léků, mutagenů)**
  - **studium poruch paměti**
  
- **Zvířata jako dárci orgánů pro transplantace (xenotransplantáty)**  
– **orgány s pozměněnými antigeními vlastnostmi vhodné pro člověka**
  
- **Zvířata produkující cizorodé látky v mléce, moči, krvi nebo tkáních (animal farming: zvířata jako bioreaktory)**



**Figure 11.18** Normal coho salmon (left) and genetically engineered coho salmon (right) containing a sockeye salmon growth-hormone gene driven by the regulatory region from a metallothionein gene. The transgenic salmon average 11 times the weight of the nontransgenic fish. The smallest

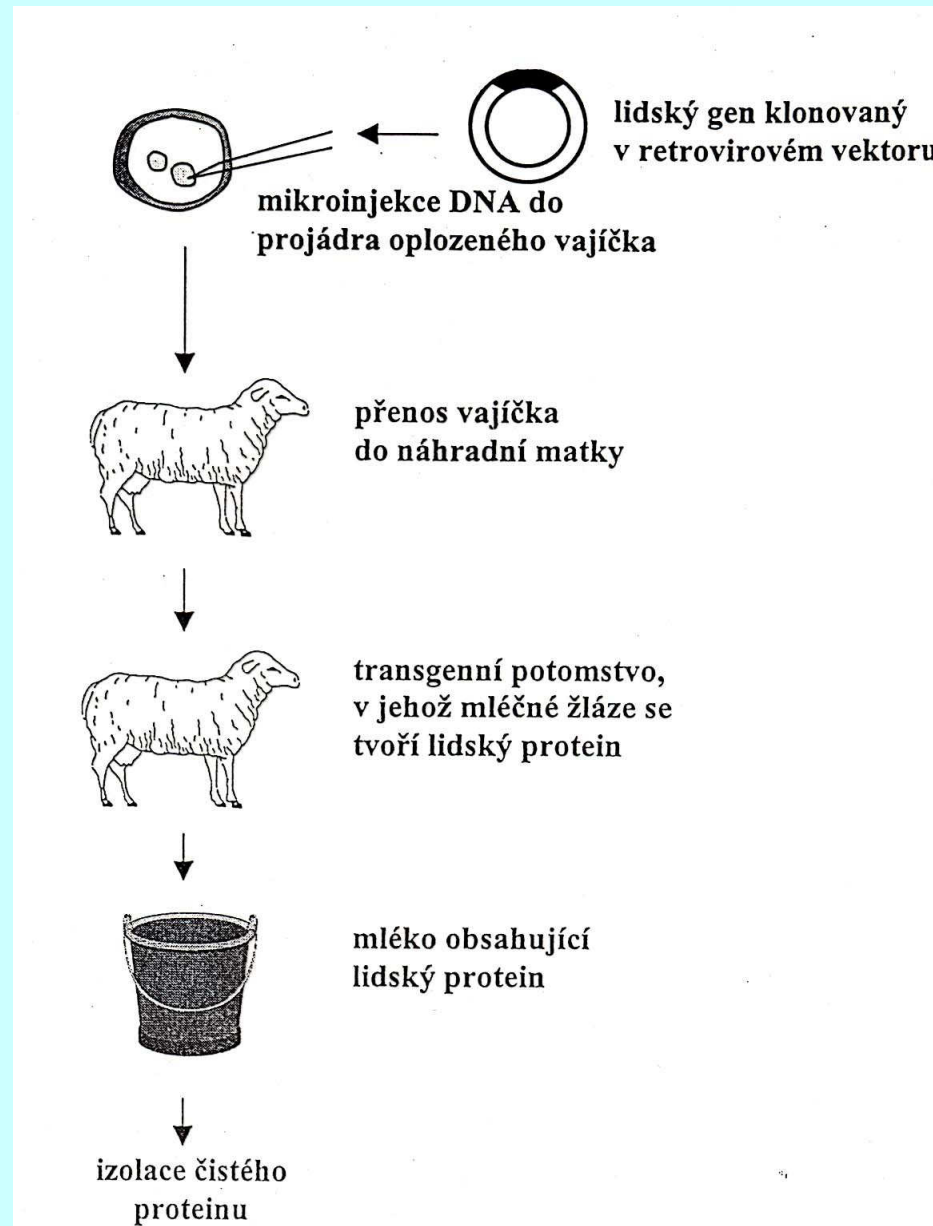
fish on the left is about 4 inches long. [Courtesy of R. H. Devlin. Reprinted by permission from *Nature* 371: 209, R. H. Devlin, T. Y. Yesaki, C. A. Biagi, E. M. Donaldson, P. Swanson, and W. K. Chan. Copyright 1994 Macmillan Magazines Ltd.]

Přenos genů do cytoplazmy přenesena DNA (účinnost 10-30%), pak krize transgenních ryb – ustavení transgenních linií

- Růstový hormon (all-fish n. all- salmon) pod kontrolou „antifreeze proteinu“ – stimule am.

**Využití ryb ke sledování mutagenních látek v prostředí:** transgen: mutantní gen pro rezistentní k antibiotikům nebo mutantní gen cII fága lambda

# Zvířata jako živé továrny („animal farming“)



## **Příklady látek vytvářených v transgenních zvířatech**

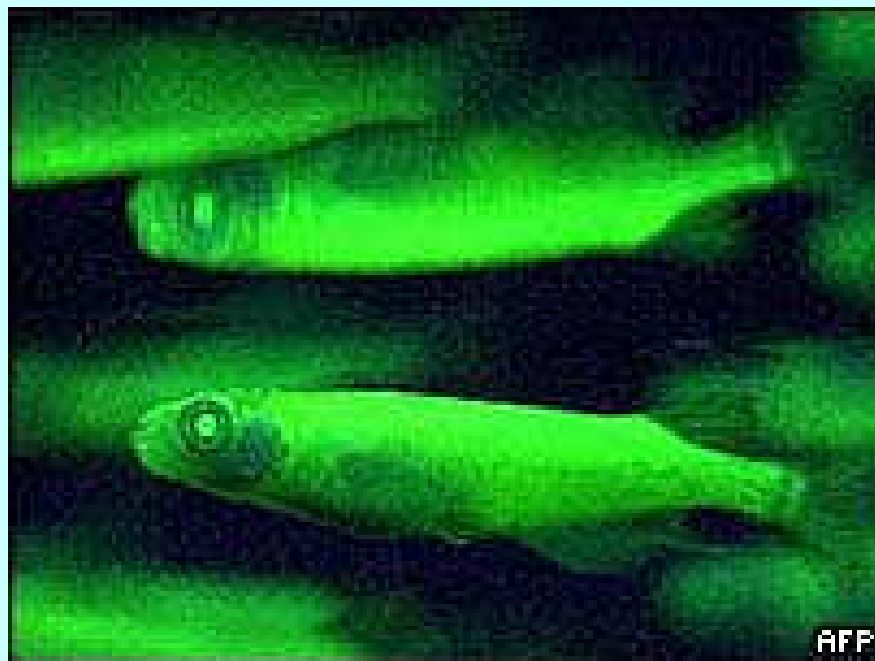
<b>Zvíře</b>	<b>Látka</b>	<b>Využití</b>
<b>ovce</b>	<b>Alfa-1-antitrypsin</b>	<b>Léčba rozedmy plic</b>
<b>koza</b>	<b>Tkáňový aktivátor plazminogenu</b>	<b>Rozpuštění krevních sraženin</b>
<b>ovce</b>	<b>Faktor pro srážení krve VIII, IX</b>	<b>Navození srážení krve</b>
<b>prase</b>	<b>hemoglobin</b>	<b>Náhražka krve při transfúzi</b>
<b>koza</b>	<b>Lidský růstový hormon</b>	<b>Léčba nanismu</b>
<b>ovce, myš</b>	<b>Regulátor CFTR</b>	<b>Léčba cystické fibrózy</b>
<b>prase</b>	<b>Lidský protein C</b>	<b>Antikoagulans krve</b>



Medúza *Aequorea victoria*, zdroj genu kódujícího  
zelený fluoreskující protein (GFP)



Geneticky modifikované myši obsahující gen GFP

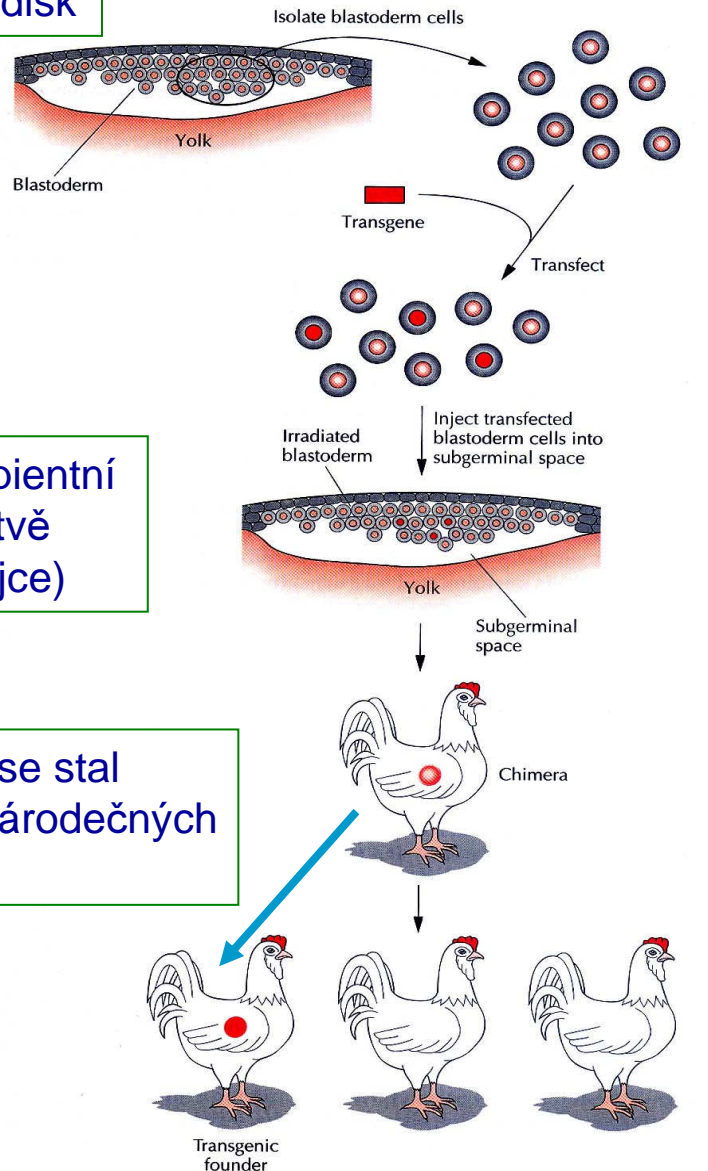


**Fluoreskující geneticky modifikovaná akvariijní rybka zebřička (*Danio rerio*) „Night Pearl“ (Noční perla) má vnesen do dědičné informace gen pro zelený fluoreskující protein medúzy nebo jeho červenou modifikaci. Původně byly tyto ryby tvořeny pro potřeby vodárenství. Měly být chovány v kontrolních nádržích a gen v nich měl začít fungovat při kontaktu ryby s nějakou toxickou látkou. Jakmile by třeba nějaký terorista kontaminoval vodárnu arzémem, ryby v příslušné nádrži by se pod vlivem arzénu „rozsvítily“**



# Příprava transgenních ptáků

germinální disk



Ozářené recipientní embryo (čerstvě nakladené vejce)

Transgen se stal součástí zárodečných buněk

Pluripotentní buňky (blastodermální a primordiální) pěstované in vitro

Cíle transgenoze u drůbeže

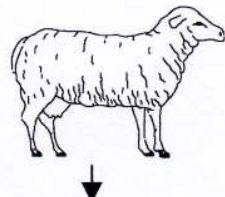
Odolnost proti virovým a bakteriálním chorobám, proti kokcidióze

Nižší obsah tuku a cholesterolu ve vejcích, vyšší kvalita masa

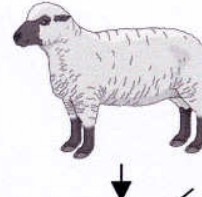
Příprava rekombinantních proteinů: monoklonální protilátky, růstový hormon, inzulin, HSA, interferon, lysozym

# Klonování savců

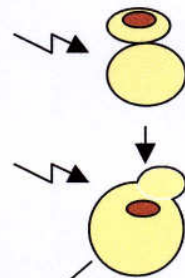
Odebrání buněk z mléčné žlázy bílé ovce a jejich přenos do media se sníženou koncentrací živin



Odebrání neoplozeného vajíčka z ovce černohubky a odstranění jeho jádra obsahujícího chromozomovou výbavu



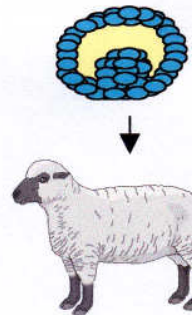
Umístění obou buněk do těsné blízkosti a navození jejich splynutí elektrickým impulzem. Další impulz nashutuje buněčné dělení



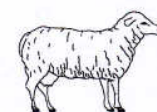
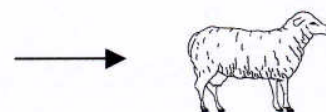
**Možnost přenosu cizích genů**



Přenos vyvíjejícího se embrya do dělohy náhradní matky, která zárodek donosí



Narozené jehně Dolly má stejnou výbavu chromozomů jako bílá ovce, z jejíž mléčné žlázy byla buňka odebrána



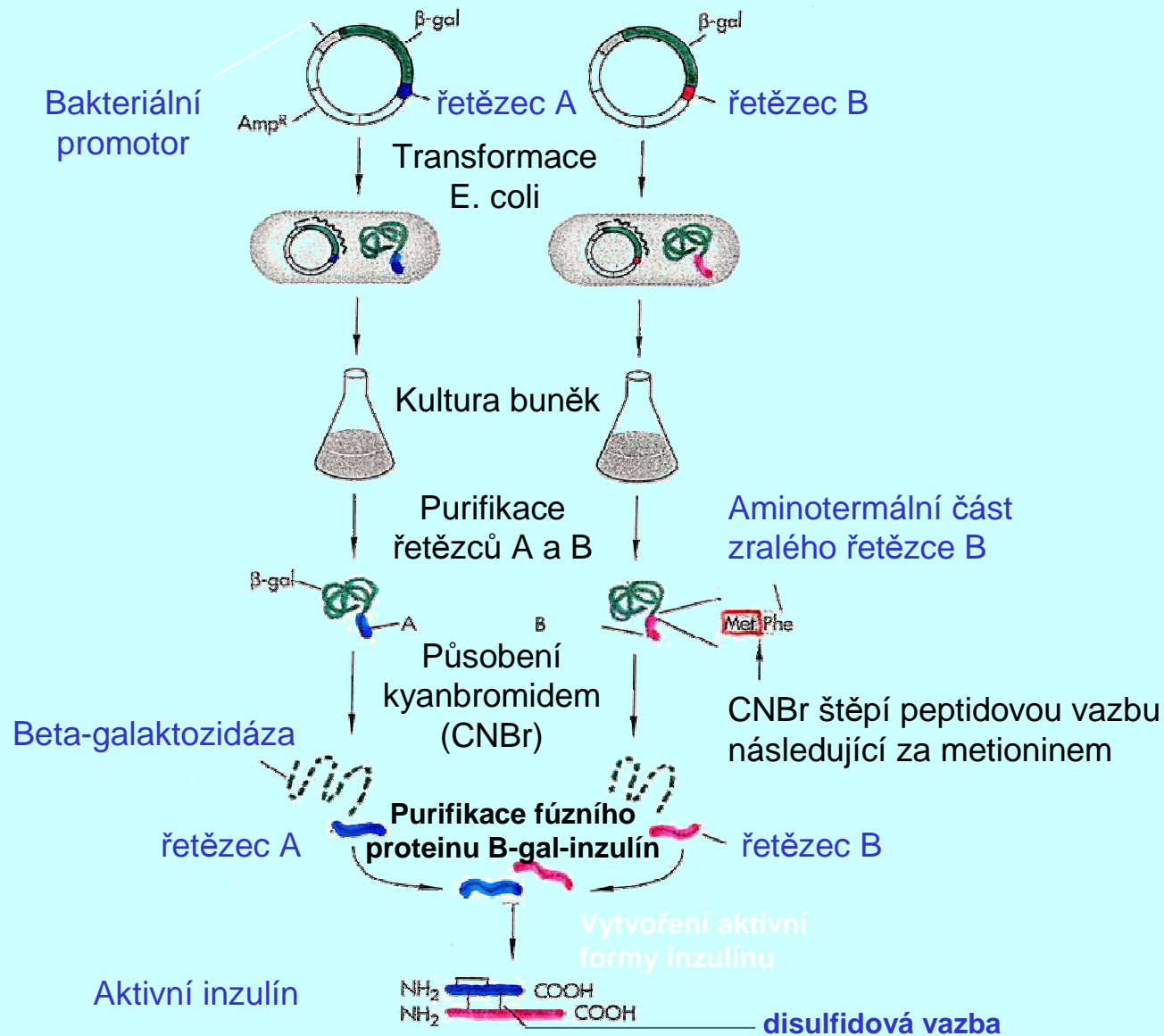
# Aplikace genového inženýrství – příprava farmakologicky nebo průmyslově významných látek

- Hormony,
- Růstové faktory
- Vakcíny,
- DNA-vakcíny
- Protilátky,
- Abzymy,
- Imunotoxiny
- Další biologicky aktivní látky (interferon, krevní srážecí faktory aj)

## **Geneticky modifikované mikroorganismy**

- **bakterie produkující průmyslově významné látky:**
  - **antibiotika,**
  - **vitaminy**
  - **mastné kyseliny**
  - **sekundární metabolity**
  - **pozměněné enzymy**
- **bakterie produkující cizorodé látky (lidské proteiny, farmaka aj)**
- **bakterie rozkládající kontaminanty prostředí (ropné produkty, průmyslové organické látky aj.)**
- **kvasinky s pozměněným metabolismem (výroba potravin a nápojů s vylepšenými vlastnostmi)**

# Příprava lidského inzulínu v bakteriálních buňkách



# Příklady látek připravovaných v druzích r. *Bacillus*

*B. amyloliquefaciens* - 90% průmyslově vyráběných enzymů

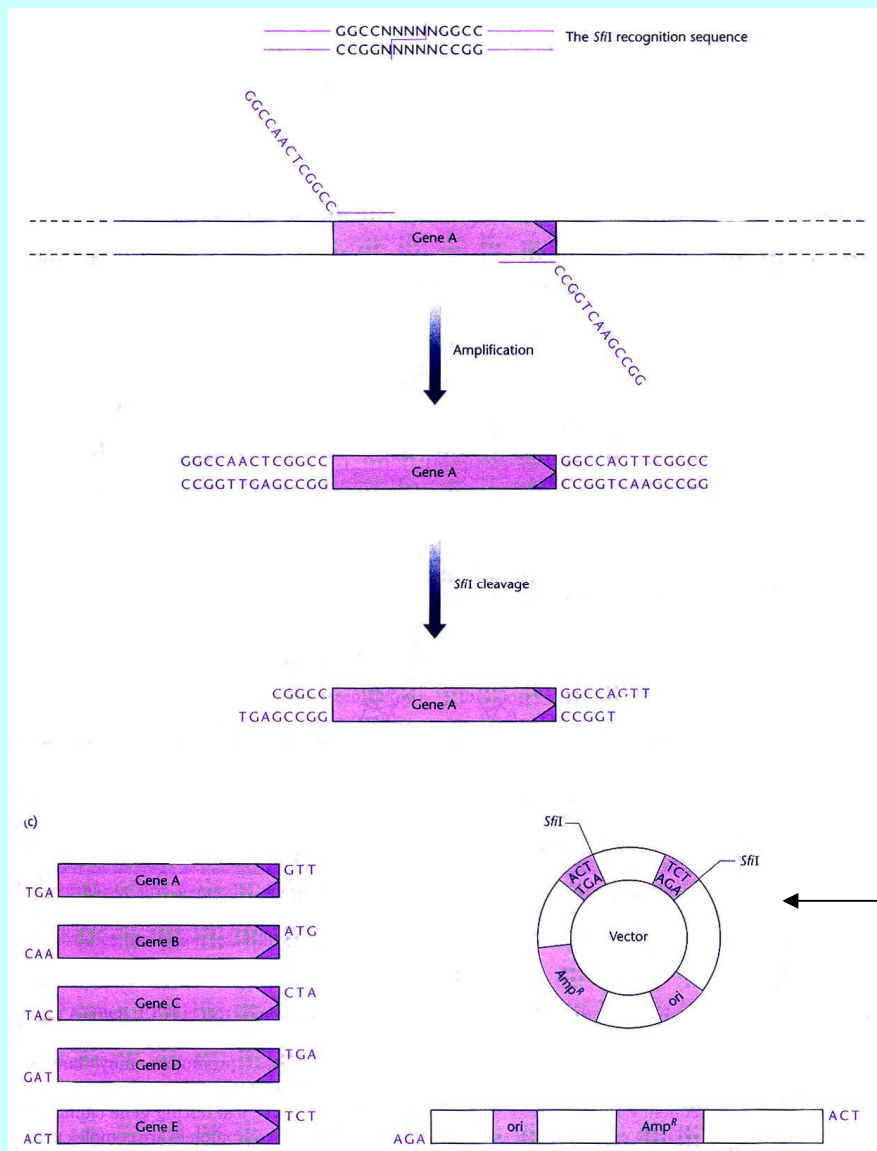
- alfa-amyláza, celulóza
- dextransáza, maltáza, pektátlyáza
- esteráza, alkalická fosfatáza
- proteázy (subtilizin)
- lysozym
- pektináza

***B. thuringiensis*:  $\delta$ -toxin**

Cizorodé látky

- interferon (myší, lidský)
- proinzulin

# Klonování klastrů genů v požadovaném pořadí



Rozpoznávací sekvence *Sfi*I –  
vnitřní část (NNNN) je variabilní

Amplifikace genu A pomocí PCR  
s primery nesoucími v extenzích  
místa *Sfi*I

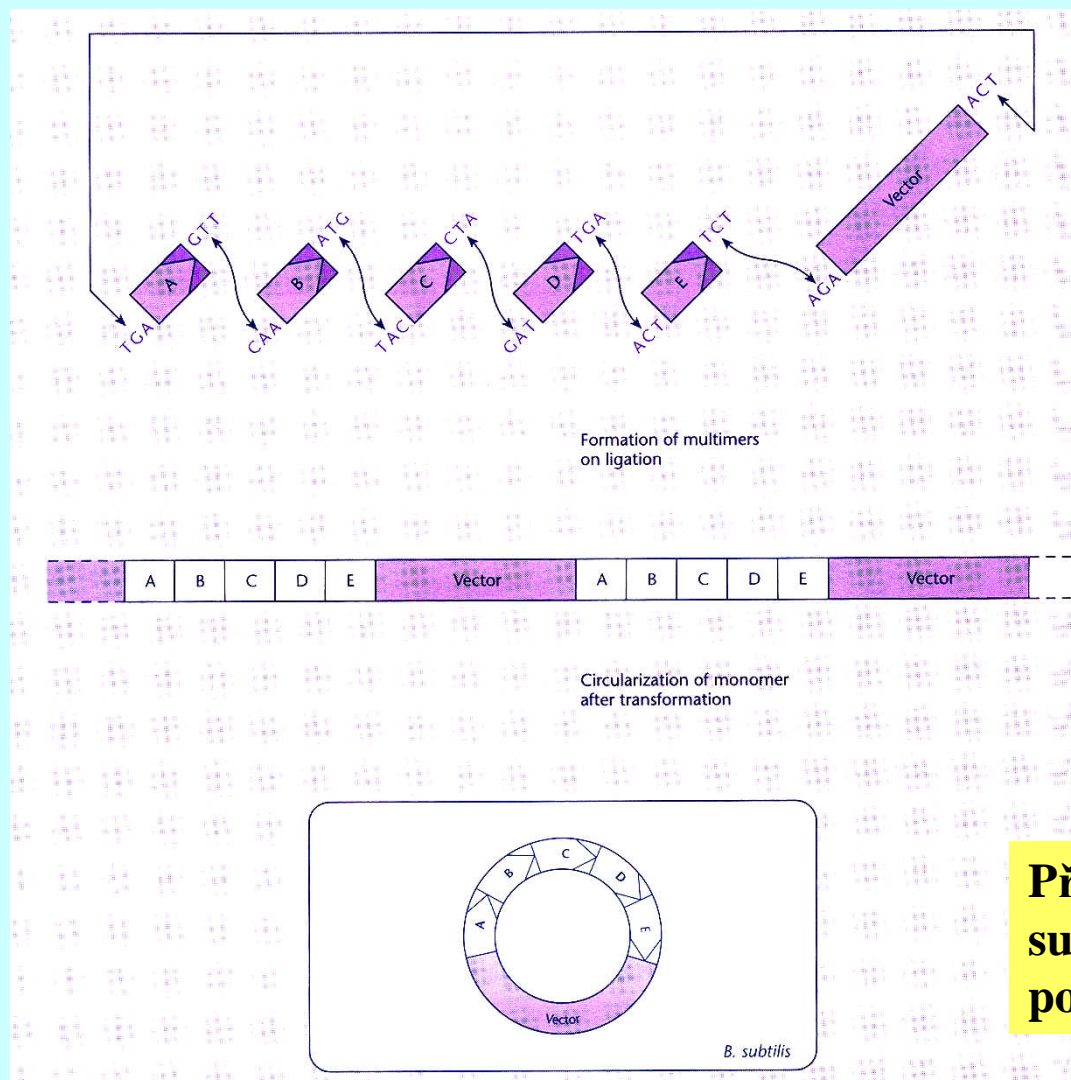
PCR produkt s extenzemi *Sfi*I

PCR produkt po štěpení *Sfi*I

Klonovací vektor



# Klonování klastrů genů v požadovaném pořadí – pokrač.



Vzájemné spojení genů vybavených *Sfi*I místy a jejich začlenění do vektoru

**Příklad: příprava kmene *B. subtilis* pro tvorbu hydrokortizonu postupným spojením 8 genů**

# Cizorodé proteiny připravené v kvasince *P. pastoris*

## Protein

Comments: mode, amount, Reference  
signal sequence

Protein	Comments: mode, amount, Reference
<b>Bacteria</b>	
<i>Bacillus licheniformis</i> $\alpha$ -amylase	S, 2.5 g l <sup>-1</sup> , SUC2 [51,60]
<i>Bacillus steurothermophilus</i> D-alanine carboxypeptidase	S, 100 mg l <sup>-1</sup> , native [61]
<i>Bordetella pertussis</i> pertussis pertactin (P69)	I, 3 g l <sup>-1</sup> [62]
<i>Clostridium botulinum</i> neurotoxin (BoNT) serotype A and B	I, 78 mg l <sup>-1</sup> [63]
<i>Clostridium botulinum</i> neurotoxin heavy chain fragment, serotype B	I, 390 $\mu$ g g <sup>-1</sup> [64]
<i>Clostridium botulinum</i> neurotoxin serotype A binding domain	I, 2.4 mg total [65]
<i>Clostridium tetani</i> tetanus toxin fragment C	I, 12 g l <sup>-1</sup> [66]
<i>Escherichia coli</i> acid phosphatase/phytase (appA2)	S, 28.9 U mg <sup>-1</sup> [67]
<i>Escherichia coli</i> $\beta$ -galactosidase	I, 2.0 $\times 10^3$ U mg <sup>-1</sup> [7]
<i>Escherichia coli</i> $\beta$ -lactamase	I [20]
<i>Leishmania major</i> cathepsin B-like protease	S, $\alpha$ -MF [68]
<i>Staphylococcus aureus</i> staphylokinase	S, 50 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF [69]
<i>Streptococcus equisimilis</i> streptokinase	I, 77 mg l <sup>-1</sup> [70]
<i>Streptomyces</i> subtilisin inhibitor	S [71]
<i>Streptomyces viridosporus</i> T7A peroxidase, endoglucanase	S, 2.47 g l <sup>-1</sup> total protein, $\alpha$ -MF [72]
<i>Toxoplasma gondii</i> SAG1 antigen	S, 12 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF [73]
<i>Vibrio cholerae</i> accessory cholera enterotoxin (Acc)	S, 7 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF [74]
<b>Fungi</b>	
<i>Alternaria</i> Alt 1 allergen	S, $\alpha$ -MF [75]
<i>Aspergillus awamori</i> glucoamylase	S, 400 mg l <sup>-1</sup> , native [76]
<i>Aspergillus awamori</i> glucoamylase catalytic domain	S, 400 mg l <sup>-1</sup> , PHO1 [47]
<i>Aspergillus fumigatus</i> catalase L	S, 2.3 g l <sup>-1</sup> , PHO1 [77]
<i>Aspergillus fumigatus</i> dipeptidyl peptidase IV (DPP IV)	S, PHO1 [78]
<i>Aspergillus fumigatus</i> dipeptidyl peptidase V (DPP V)	S, 0.15 mg l <sup>-1</sup> , PHO1 [79]
<i>Aspergillus giganteus</i> $\alpha$ -sarcin ribotoxin	S, 1 mg l <sup>-1</sup> , synthetic native, PHO1 [43]
<i>Aspergillus niger</i> phytase (phyA)	S, 65 U ml <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF [80]
<i>Candida guilliermondii</i> xylose reductase gene (xyll)	I, 0.65 U mg <sup>-1</sup> ; S, 0.18 U mg <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF [81]
<i>Candida rugosa</i> lipase I (CRL)	S, 150 U ml <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF [42]
<i>Fusarium solani</i> pectate lyase (pelC)	S, 1 mg l <sup>-1</sup> , PHO1 [82]
<i>Fusarium solani</i> pectate lyase (pelD)	S, native [83]
<i>Geotrichum candidum</i> lipase isoenzymes	S, 60 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF [84]
<i>Phytophthora cryptogea</i> $\beta$ -cryptogein	S, 45 mg l <sup>-1</sup> , PHO1 [85]
<i>Rhizopus oryzae</i> lipase	S, 60 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF [86]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> invertase	S, 2.5 g l <sup>-1</sup> , native [30]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ktrlp	S, 400 mg l <sup>-1</sup> ; PHO1 [87]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( $\alpha$ -1,2-mannosyltransferase)	S, 40 mg l <sup>-1</sup> , PHO1 [87]
<i>Schizophyllum commune</i> vitamin B2-aldehyde-forming enzyme	S, 120 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF [88]
<i>Trametes versicolor</i> (white rot fungus) laccase (lccI)	S, native and $\alpha$ -MF [89]
<i>Trichoderma harzianum</i> $\beta$ -(1-6)-glucanase	S, 9.3 mg l <sup>-1</sup> [90]

I = intracelulární,  
S = sekretovaný

# Dělení očkovacích látek podle mechanismu účinku

**Živé vakcíny:** tyto vakcíny obsahují vlastní infekční agens v oslabené (atenuované) formě, která nemůže očkovaného jedince ohrozit propuknutím infekce. Jde například o vakcíny proti některým virovým chorobám (spalničky, příušnice, zarděnky).

**Inaktivované vakcíny:** tyto vakcíny obsahují vlastní infekční agens v usmrcené podobě. Patří sem například vakcíny proti některým virózám (chřipka, klíšťová encefalitida či vzteklna).

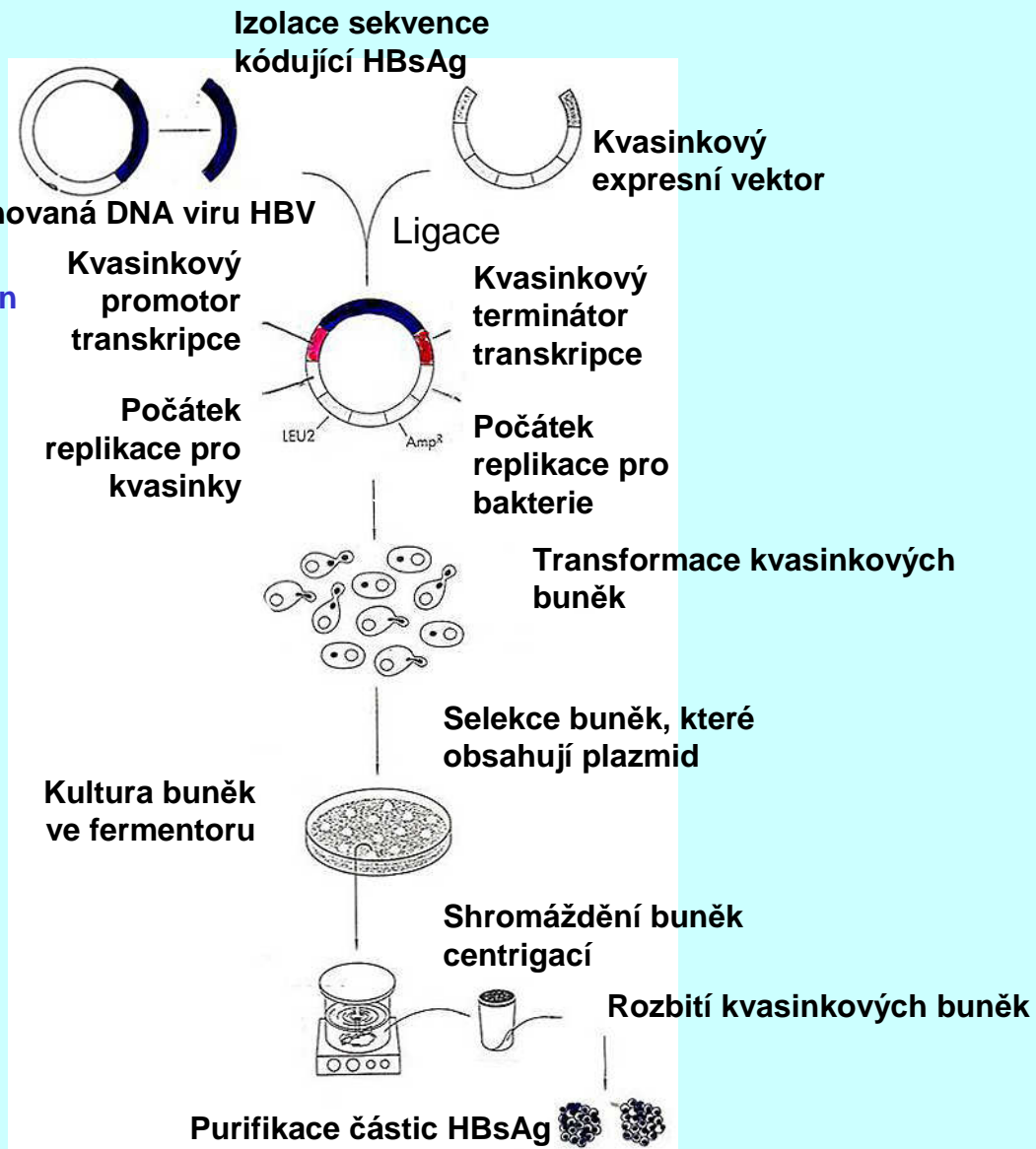
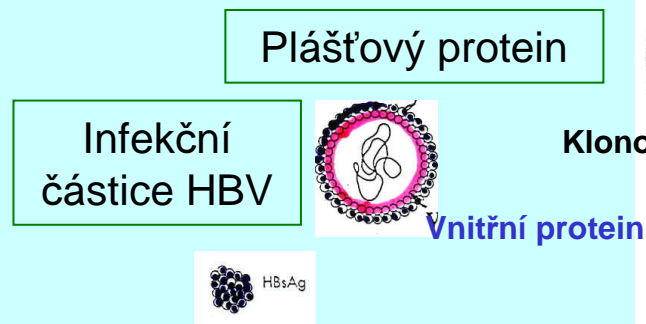
**Subjednotkové vakcíny:** tyto vakcíny obsahují pouze určité složky patogenu, proti kterým se má nově vznikající imunita organizmu zaměřit. Tyto typy vakcín se používají například proti opouzdřeným bakteriím, jako jsou *H. influenzae* či meningokoky; ve vakcínách jsou využity jednotlivé složky jejich polysacharidového pouzdra.

**Rekombinantní vakcíny:** vakcíny připravované metodami genového inženýrství. Specifické proteinové antigeny určitého patogenu (typicky například viru Hepatitidy B) jsou uměle syntetizovány v kvasinkách a následně tvoří základní součást rekombinantní vakcíny.

**Toxoidy (anatoxiny):** představují specifický typ vakcín, kdy hlavním cílem imunitní reakce není samotný patogen, ale jeho toxin. Samozřejmě i tento toxin musí být inaktivovaný, aby jeho aplikace nezpůsobila klinické projevy dané toxikózou. Typicky jsou tyto vakcíny používány k prevenci tetanu či záškrtu.

**DNA vakcíny:** ačkoliv se prozatím v praxi příliš neuplatnily, představují DNA vakcíny nadějný příslib do budoucna. Jejich princip je do jisté míry obdobný jako u rekombinantních vakcín, ovšem vektor s příslušnou DNA sekvencí je podán přímo očkovanému jedinci, který následně sám vytváří imunogenní antigeny ve svém těle. Přetrvávající stimulace navíc může zajistit skutečně dlouhodobou imunitu

# Příprava podjednotkové vakcíny viru HBV v kvasinkách



## Výhody:

1. Přesně definovaný antigen
2. Stabilní, skladovatelný
3. Nevyvolává vedlejší účinky

## Nevýhody

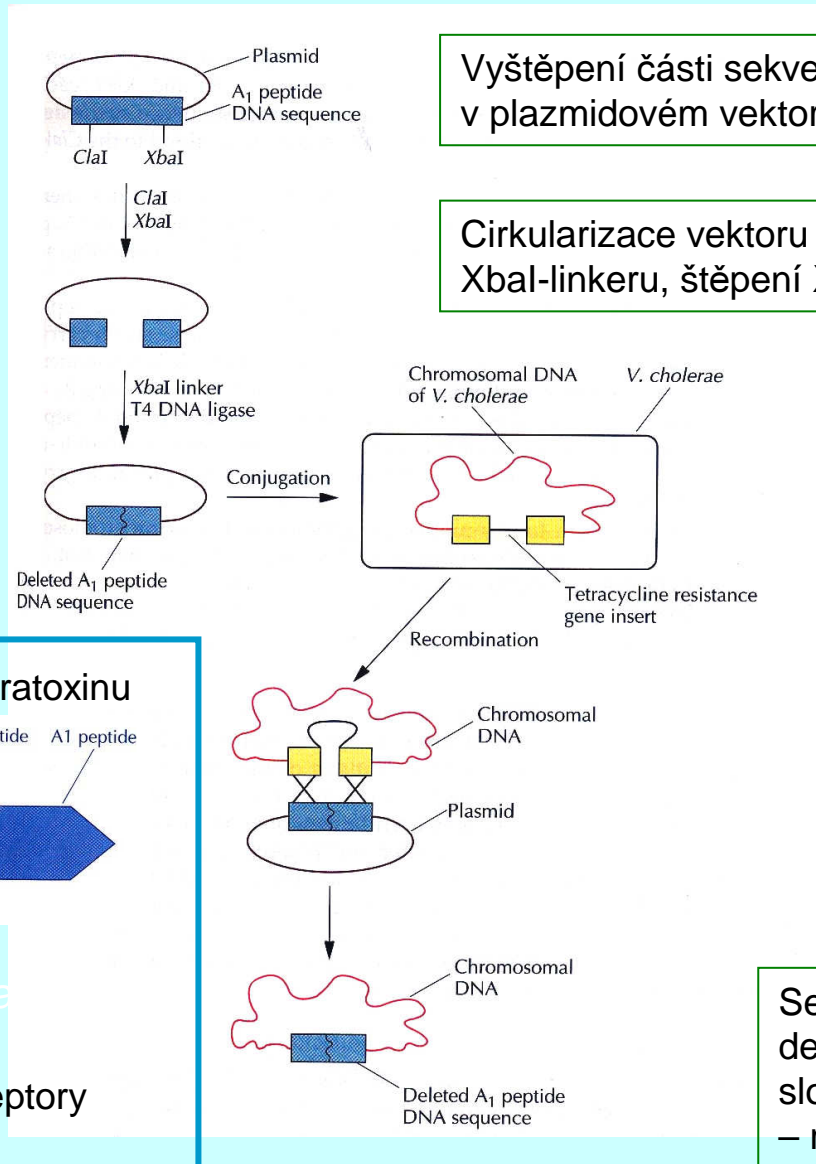
1. Drahá purifikace
2. Odlišná konformace proteinu



## Příklady rekombinantních vakcín

Produkt	Společnost	Terapeutické použití	
<b>Recombinant vaccines</b>			
<i>Hepatitis B</i>			
Ambirix (combination vaccine, containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	GlaxoSmithKline	Immunization against hepatitis A and B	2002 (EU)
Pediarix (combination vaccine containing rHBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization of children against various conditions inducing hepatitis B	2002 (US)
HBVAXPRO (r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> )	Aventis Pharma	Immunization of children & adolescents against hepatitis B	2001 (EU)
Twinrix (adult & pediatric forms in EU. Combination vaccine containing rHBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham (EU); GlaxoSmithKline (US)	Immunization against hepatitis A and B	1996 (EU) (adult), 1997 (EU) (pediatric), 2001 (US)
Infanrix-Hexa (combination vaccine, containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization against diphtheria, tetanus, pertussis, <i>Haemophilus influenzae</i> type b, hepatitis B and polio	2000 (EU)
Infanrix – Penta (combination vaccine, containing rHBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization against diphtheria, tetanus, pertussis, polio and hepatitis B	2000 (EU)
Hepacare (r S, pre-S & pre-S2 HBsAg produced in a mammalian (murine) cell line)	Medeva Pharma	Immunization against hepatitis B	2000 (EU)
Hexavac (combination vaccine, containing rHBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	Aventis Pasteur	Immunization against diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B, polio and <i>H. influenzae</i> type B	2000 (EU)
Procomvax (combination vaccine, containing r HBsAg as one component)	Aventis Pasteur	Immunization against <i>H. influenzae</i> type B and hepatitis B	1999 (EU)
Primavax (combination vaccine, containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	Aventis Pasteur	Immunization against diphtheria, tetanus, and hepatitis B	1998 (EU)
Infanrix Hep B (combination vaccine containing rHBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization against diphtheria, tetanus, pertussis and hepatitis B	1997 (EU)
Twinrix (adult and pediatric forms; combination (pediatric) vaccine containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization against hepatitis A and B	1996 (EU) (adult), 1997 (EU)
Comvax (combination vaccine, containing HbsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> , as one component)	Merck	Vaccination of infants against <i>H. influenzae</i> type B and hepatitis B	1996 (US)

# Strategie pro vytvoření delece části peptidu A1 cholera toxinu – příprava kandidátního vakcinačního kmene



Vyštěpení části sekvence kódující peptid A1 (klonované v plazmidovém vektoru) – vyštěpí se ~ 90% aminokyselin)

Cirkularizace vektoru (připojení *XbaI*-linkeru, štěpení *XbaI*-ligace)

Přenos vektoru do kmene, v němž je uvnitř genu pro A1 začleněn gen pro tetracyklin (A1 je inaktivován, buňky jsou TetR) – potenciální reverze A1 vyčleněním tetR – proto není vhodný jako vakcína

Vektor se po několika generacích spontánně vyřadí

Selekce buněk TetS, obsahujících deletovanou formu A1 – tyto buňky tvoří složku A2 a B, a jsou proto imunogenní – reverze není možná

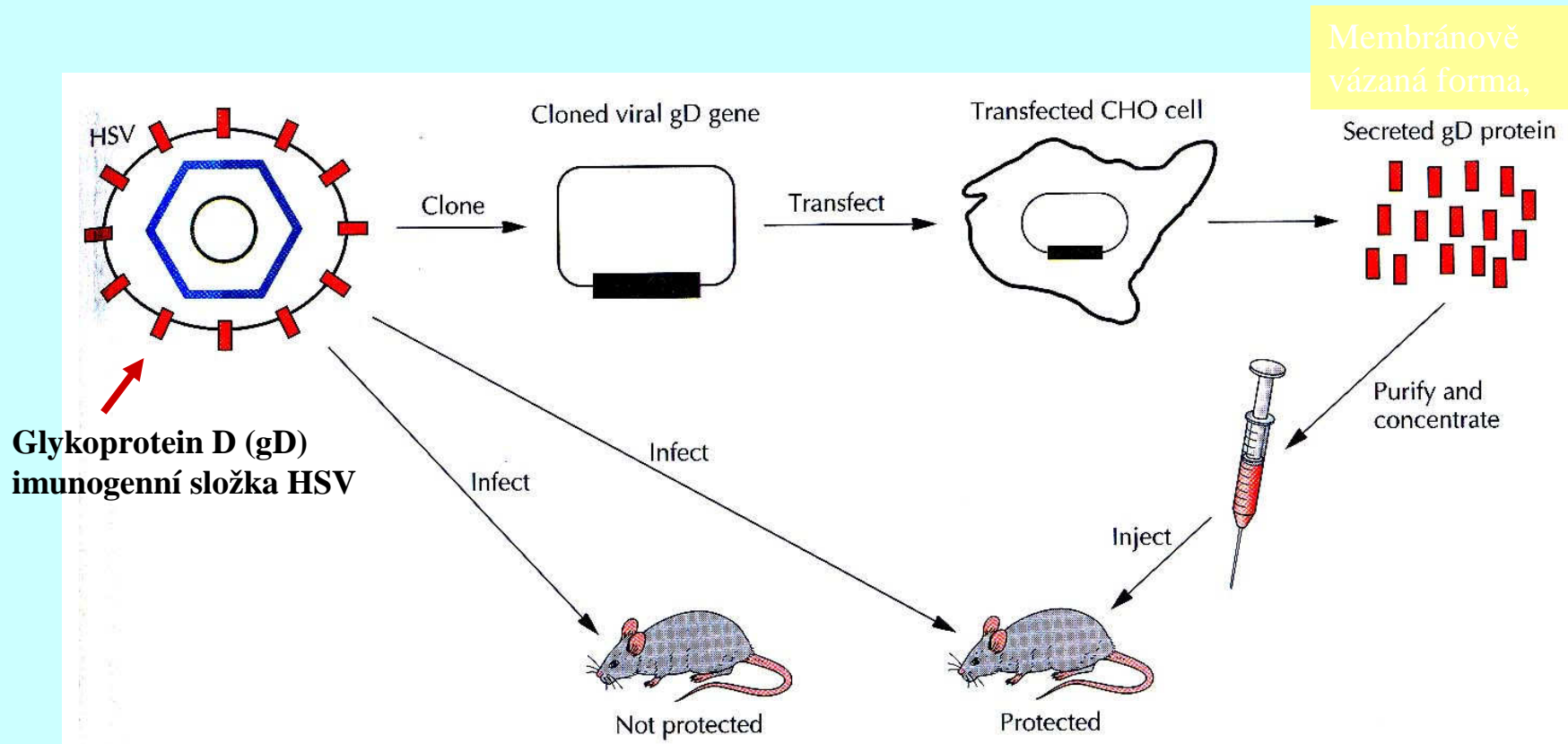
**Struktura cholera toxinu**

B subunit    A2 peptide    A1 peptide

vla

Vazba na receptory mukózy

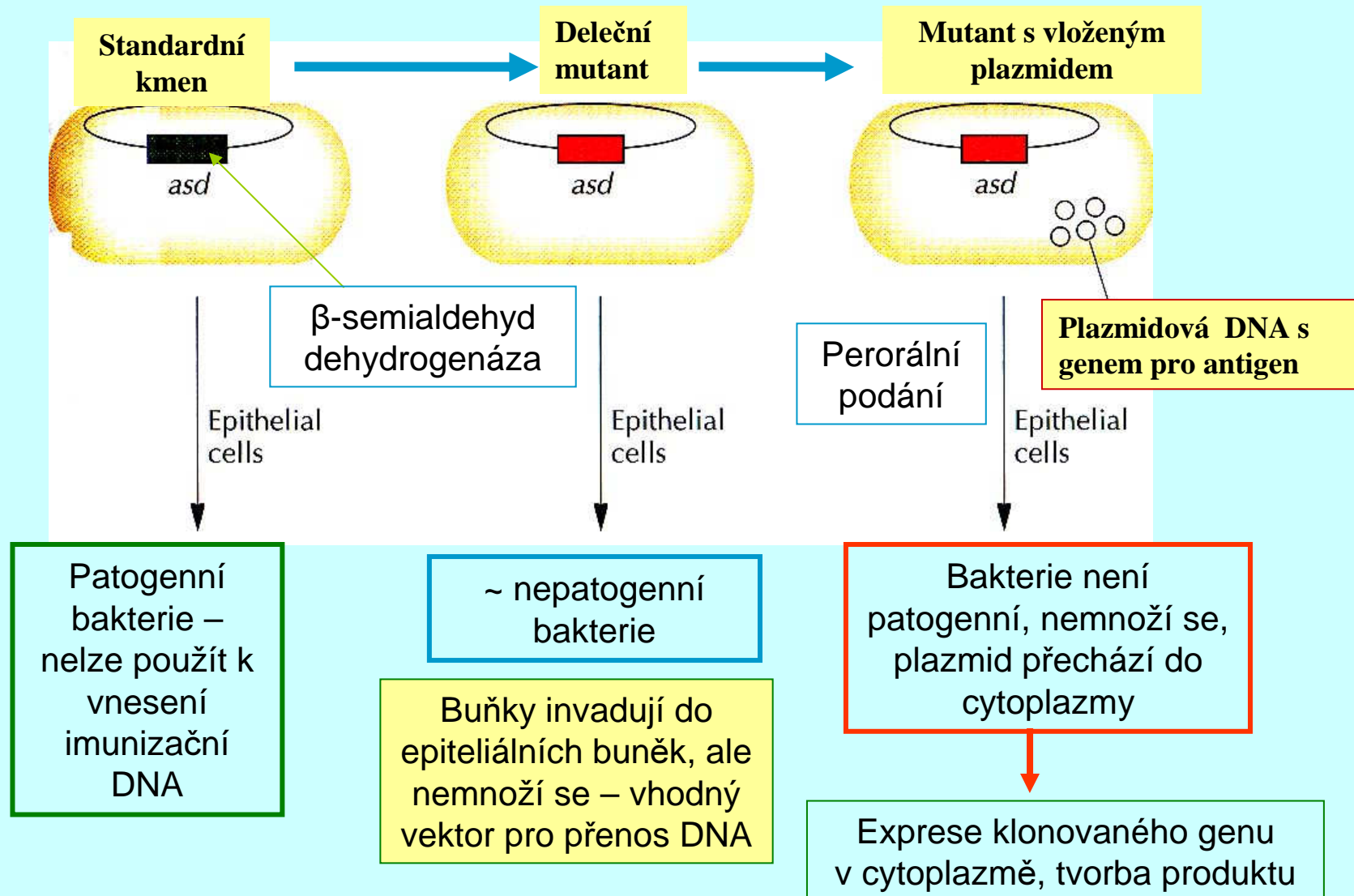
# Příprava podjednotkové vakcíny proti HSV v buňkách CHO (chinese hamster ovary)



HSV – onkogenní virus, sexuálně přenosná onemocnění, encefalitida, infekce oka



# Využití patogenního druhu *Shigella flexneri* jako živého vektoru k přenosu DNA pro genetickou imunizaci do savčích epitelálních buněk



# DNA vakcíny - genetická imunizace

**Princip: Gen kódující antigen je vnesen do buněk zvířete, v nichž je pak tento antigen produkován a zvíře vytváří protilátky**

Přenos DNA:

- biolistická metoda: rekombinantní plazmid (E. coli) nesoucí gen pro antigen pod kontrolou virového promotoru je vnesen (nastřelen) např. do boltce myši
- injekce velkých množství DNA (100 mg rek. plazmidu) přímo do svalů zvířat – účinnost přenosu až 70%
- Elektroporace: vnesení genu pomocí elektrického impulzu

Výhody:

- antigen je správně posttranslačně upraven a není třeba jej purifikovat
- na jednom plazmidu mohou být v jednom kroku přeneseny geny pro více antigenů

Nevýhoda:

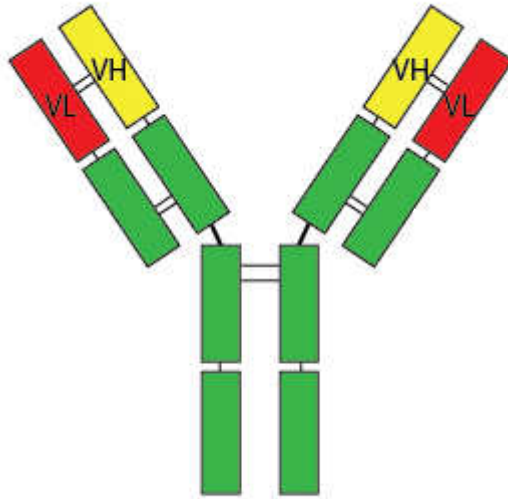
- neznalost osudu přenesené DNA v buňkách, začlenění do genomu hostitele a přerušení genů – proto je výhodnější transientní exprese (extrachromozomální stav)

**Příklady virových antigenů: chřipka, HIV, bovinní HV, vzteklna, HBV, rotavirus, slintavka a kulhavka, aj.**

**Bakteriální antigeny: Clostridium tetani, Mycobacterium tuberculosis,**

## Jednořetězcové protilátky: scFv - single chain antibody variable region fragments (SCA)

a)

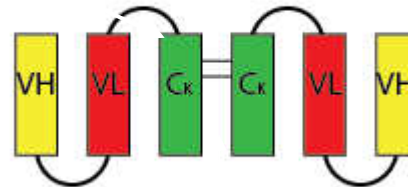


b)



(glycin<sub>4</sub>serin)<sub>3</sub>

c)



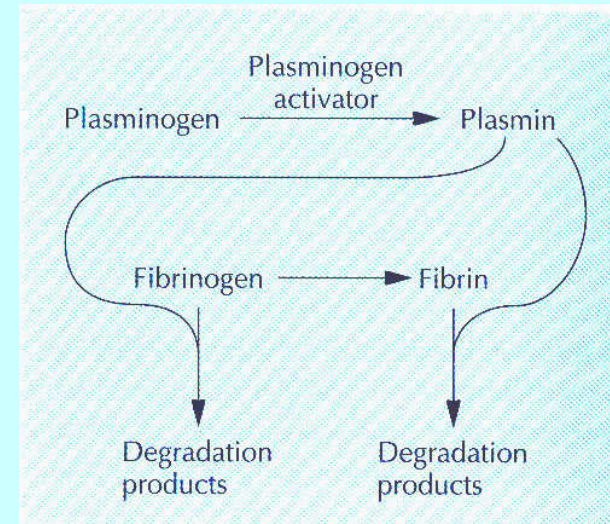
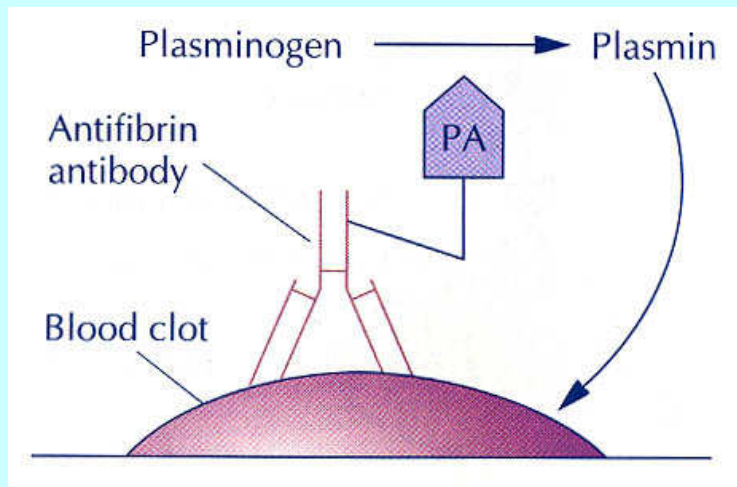
Disulfidické můstky

Linker je nutný  
pro vytvoření  
konformace  
schopné vázat  
antigen

scFv – terapeutické agents – nové vazebné schopnosti, nižší imunogenicita v důsledku chybění Fc domény, snadnější penetrace do cílového místa (pevné nádory atp).

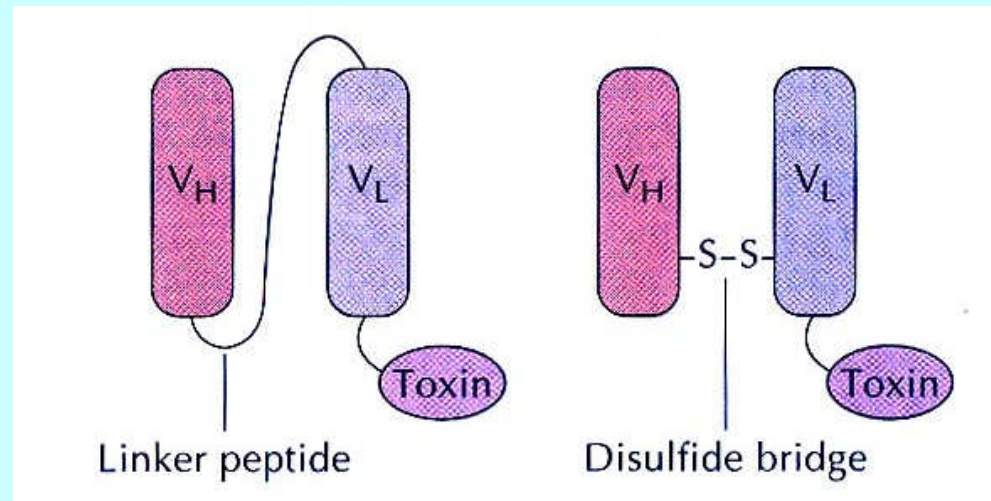
# Terapeutické protilátky

**Aktivace plazminogenu na plazmin, degradace fibrinu**



**Struktura imunoterapeutické trombolytické protilátky: antifibrinová monoklonální protilátka se specificky váže na fibrin krevní sraženiny a aktivátor plazminogenu (PA), který je její součástí, aktivuje plazmid, který pak rozpouští krevní sraženinu**

# Imunotoxin: terapeutická protilátka specificky rozpoznává např. nádorové buňkynebi buňky patogenů



- **exotoxin A *Pseudomonas***
- **difterický toxin**
- **ricin**

Protinádorové působení (vazba na receptory a povrchové proteiny nádorových buněk)

Záměna peptidového linkeru za disulfidický můstek několikanásobně zvyšuje stabilitu scFv a tím zlepšuje jeho terapeutické využití

Např. fúzní protein  
HER2-Ig + exotoxin *Pseudomonas*  
human epidermal growth factor receptor 2

Pbs21 (plasmodium) + Shiva-1



## Příklady terapeutických monoklonálních protilátek schválených pro použití u člověka v USA nebo v evropských zemích

Datum schválení	Typ protilátky	Společnost	Terapeutické použití
1986	Mouse	Ortho Biotech	Prevention of acute kidney transplant rejection
1994	Chimeric	Centocor	Prevention of blood clots
1997	Chimeric	Genentech, Idec Pharmaceuticals	Non-Hodgkin lymphoma
1997	Humanized	Protein Design Labs, Hoffmann-La Roche	Prevention of acute kidney transplant rejection
1998	Chimeric	Centocor, Schering-Plough	Crohn disease and rheumatoid arthritis
1998	Chimeric	Novartis	Prevention of acute kidney transplant rejection
1998	Humanized	Genentech	HER2-positive breast cancers
1998	Humanized	Medimmune	Respiratory syncytial virus infection in children
1998	Chimeric	Hoffmann-La Roche	Non-Hodgkin lymphoma
2000	Humanized	American Home Products, Celltech	Relapsed acute myeloid leukemia
2001	Humanized	Millennium Pharmaceuticals, Schering	Chronic lymphocytic leukemia
2001 pending	Humanized	Genentech, Novartis, Tanox	Asthma

In addition to the antibodies listed here, 11 have been approved for diagnostic purposes.

**Imunotoxin = MAB s navázaným toxinem (ricin, difterický toxin aj)**

# GENOVÉ TERAPIE

## LÉČBA GENETICKÝCH CHOROB

- DĚDIČNÝCH
- NÁDOROVÝCH

➤ **PODLE TYPU BUNĚK, DO NICHŽ JSOU GENY VNÁŠENY:**

- GENOVÁ TERAPIE ZÁRODEČNÝCH BUNĚK**
- GENOVÁ TERAPIE SOMATICKÝCH BUNĚK**

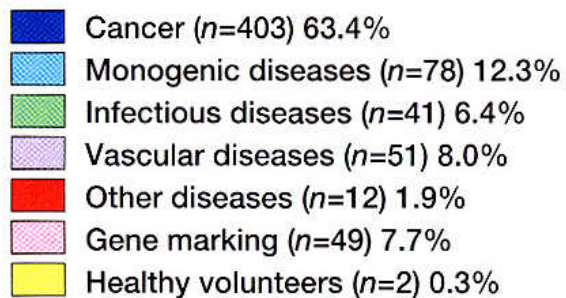
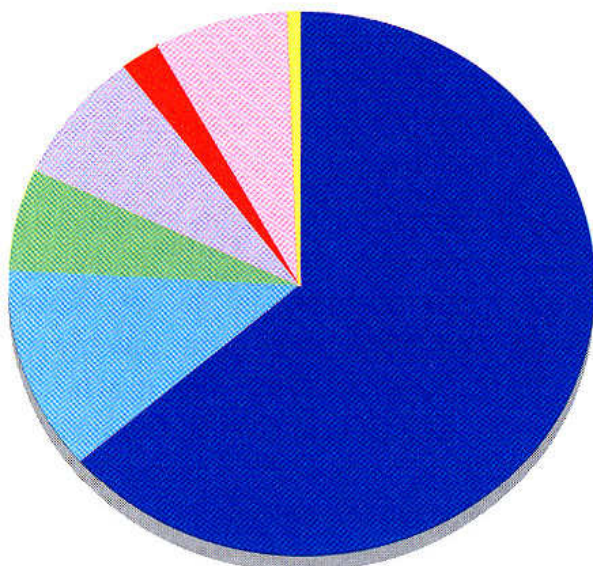
➤ **PODLE ZPŮSOBU PŘENOSU GENŮ**

- GENOVÁ TERAPIE *IN VITRO* (*EX VIVO*)**
- GENOVÁ TERAPIE *IN VIVO***

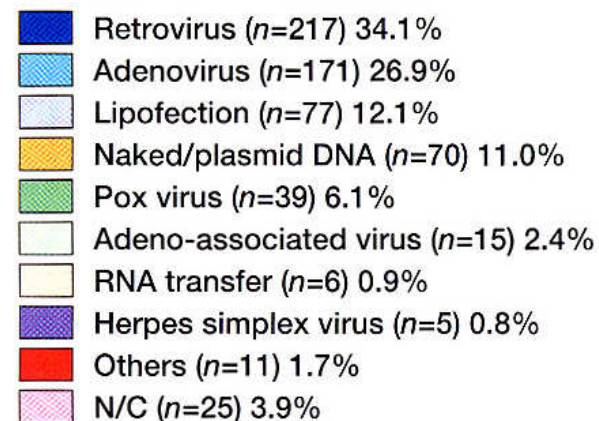
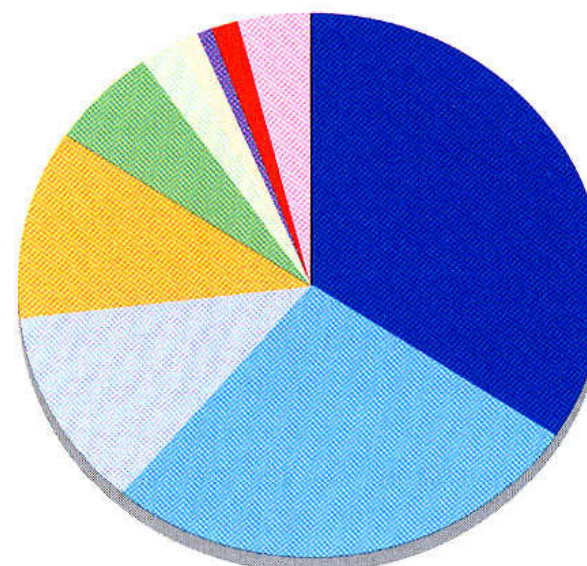


# Přehled schválených protokolů genové terapie

(A) Protocols by disease

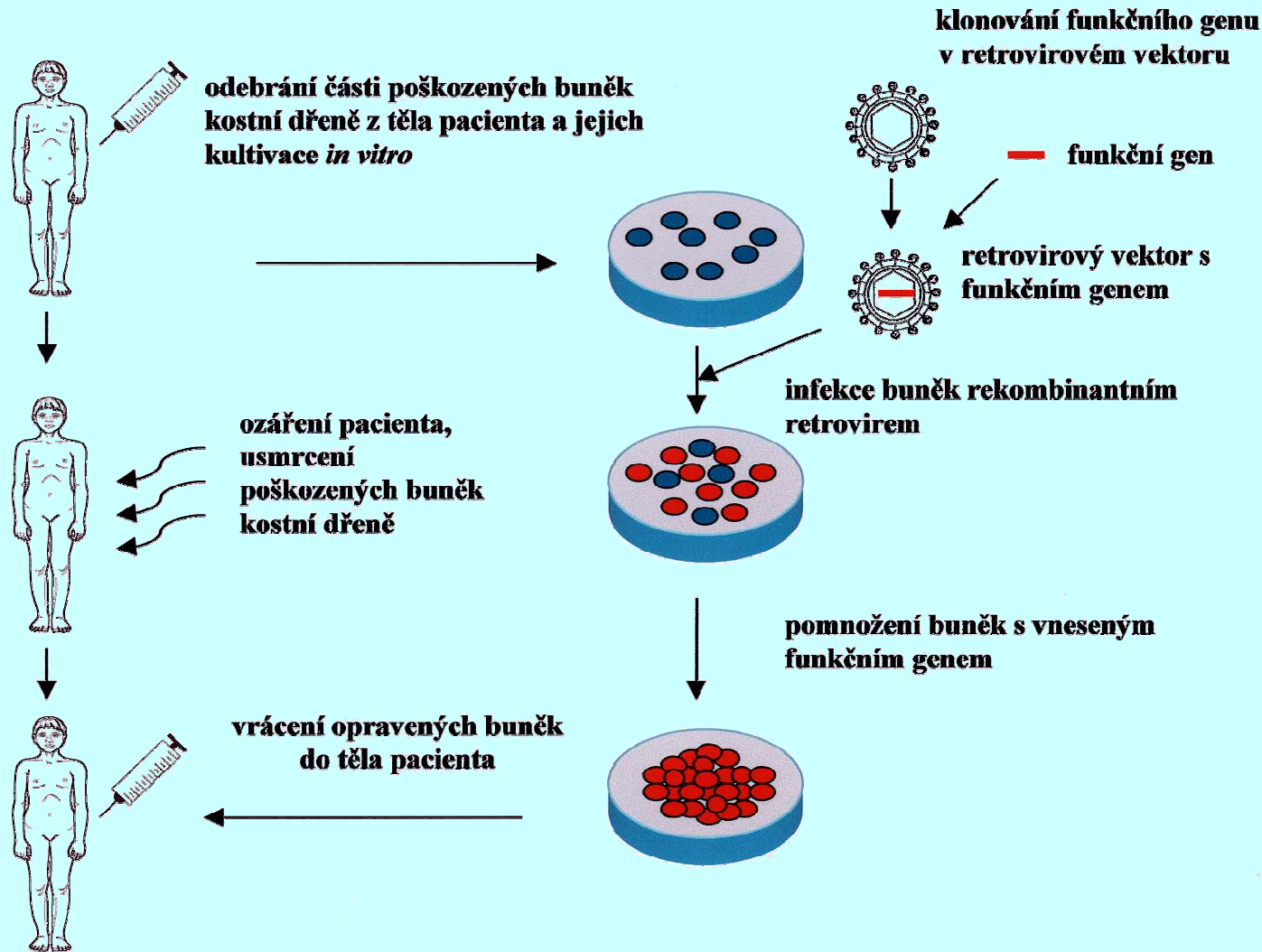


(B) Protocols by vector



# Genová terapie *in vitro*

*ex vivo*



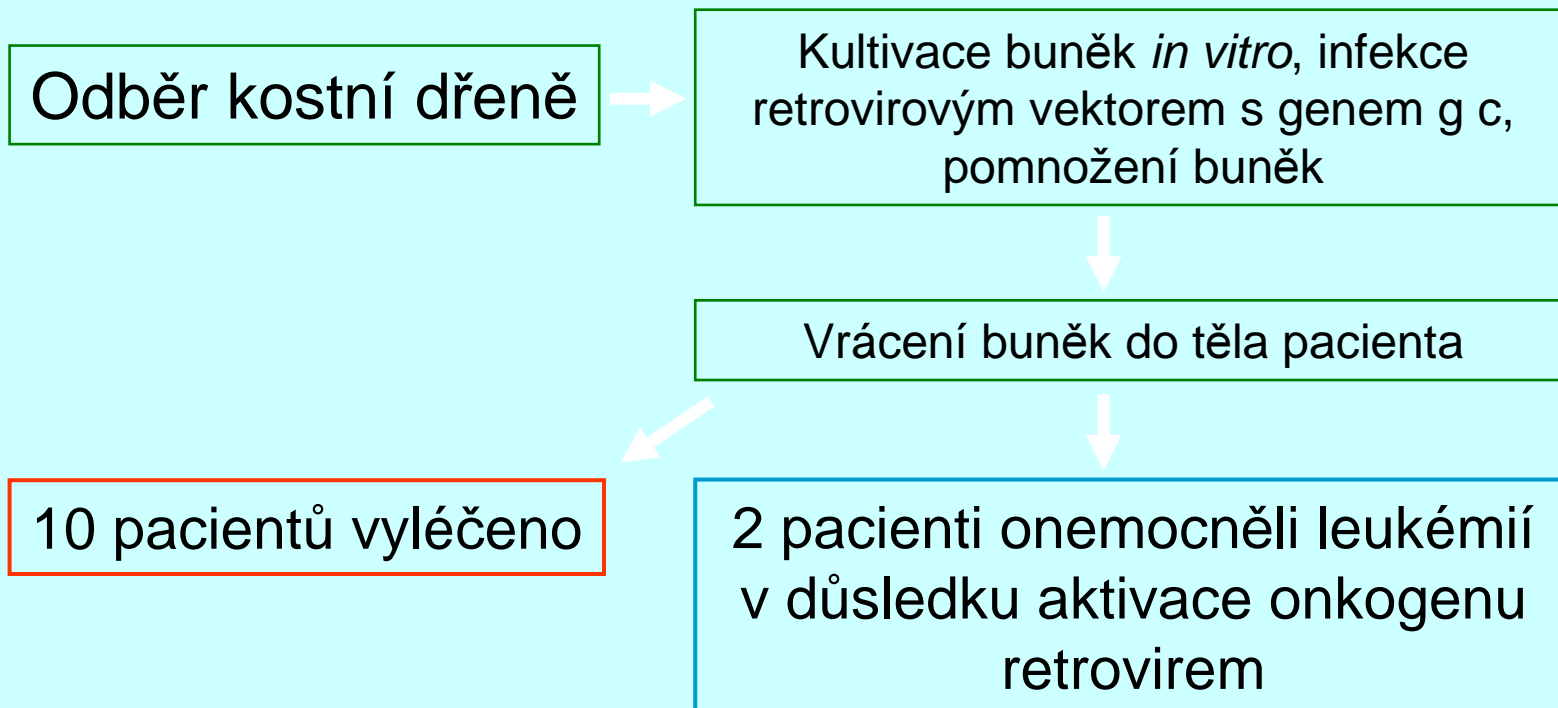
## Příklady lidských chorob podmíněných monogenně a připadajících v úvahu pro genovou terapii v současnosti

Nemoc	Hlavní symptomy	Produkt defektního genu	Četnost
Deficience adenosin-deaminázy (ADA)	Defektní T-lymfocyty, porucha v tvorbě protilátek, narušení imunitního systému.	adenosindeamináza	1/10 <sup>6</sup>
Fenylketonurie	Fyzická a psychická retardace.	fenylalaninhydroxyláza	1/12 000
Hemofilie A + B	Porucha v srážlivosti krve, krvácivost.	faktor VIII, faktor IX	1/10 <sup>6</sup> mužů
Familiární hypercholesterolemie	Předčasné arteriosklerotické změny cév.	LDL-receptor	1/500
Deficience na $\alpha_1$ -antitrypsin	Plicní emfyzém, (rozedma plic).	$\alpha_1$ -antitrypsin	1/3 500
Cystická fibróza, CF	Porucha v transportu Na <sup>-</sup> , zahlenění dýchacích cest, embolie.	transmembránový regulátor CF	1/2 500
Gaucherova choroba	Nádory sleziny, zvětšení jater, žluté zbarvení (pigmentace) kůže.	glukocerebrozidáza	?
Duchennova svalová dystrofie	Svalová ochablost.	dystrofin	1/3 000 mužů
Leschův-Nyhanův syndrom	Usazování kyseliny močové v kloubech a ledvinách, poruchy CNS.	hypoxantinguaninfosforibozyltransferáza	1/10 <sup>6</sup>

# Dosud jediný příklad úspěšné léčby chorob genovou terapií

X-SCID – těžká kombinovaná imunodeficience vázaná na X chromozom: mutace genu kódujícího  $\gamma$  c-řetězec receptoru pro interleukin 2, která zabraňuje normálnímu vývoji T-lymfocytů a „killer“ buňkám

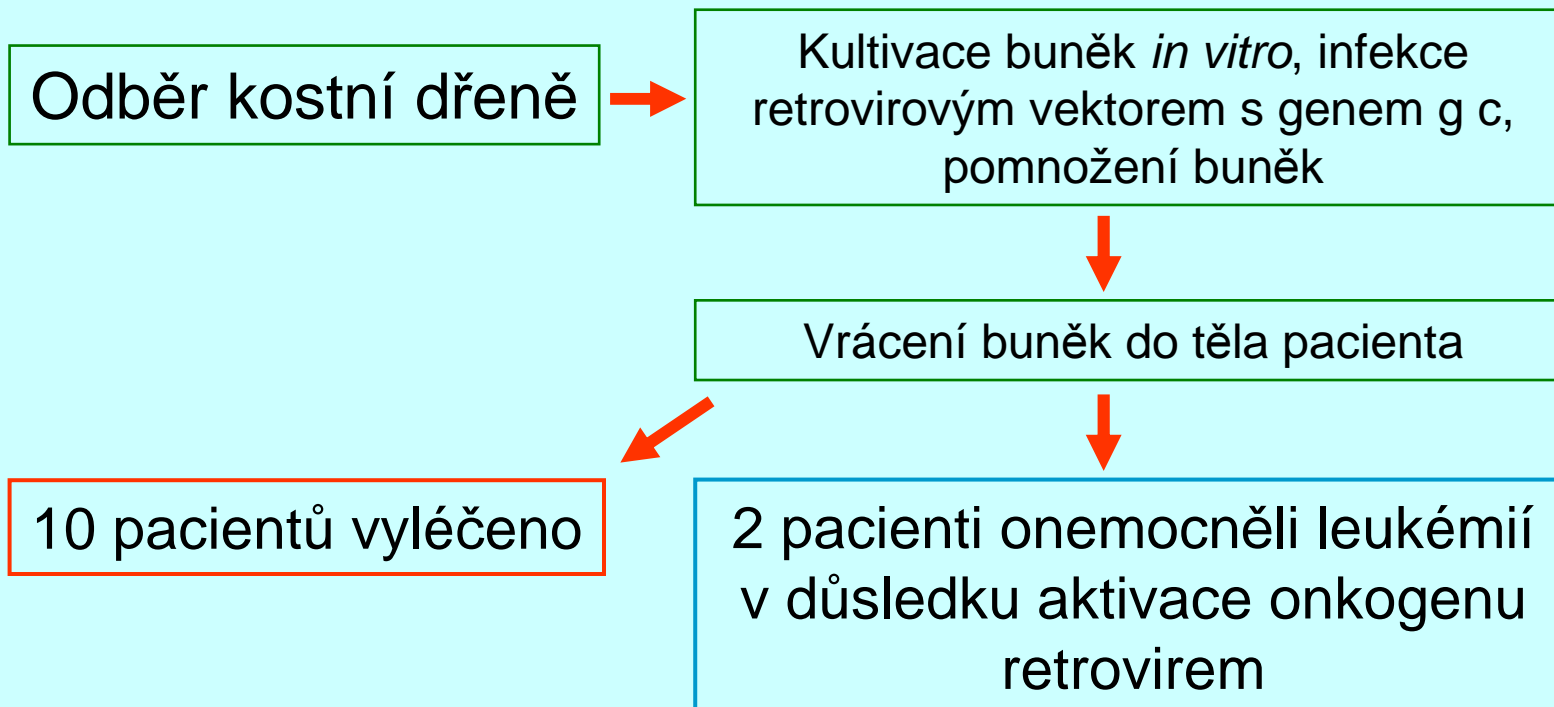
(náchyllost k infekcím, bez transplantace kostní dřeně smrt do 1 roku života)



# Dosud jediný příklad úspěšné léčby chorob genovou terapií

X-SCID – těžká kombinovaná imunodeficience vázaná na X chromozom: mutace genu kódujícího  $\gamma$  c-řetězec receptoru pro interleukin 2, která zabraňuje normálnímu vývoji T-lymfocytů a „killer“ buňkám

(náchylnost k infekcím, bez transplantace kostní dřeně smrt do 1 roku života)



## Příklady léčby nádorů pomocí genové terapie

Typ nádoru	Změněné buňky	Použitá strategie genové terapie
Vaječník	Nádorové buňky	Intraperitoneální injekce retrovirů nebo adenovirů s genem p53 nebo BRCA1 – obnova kontroly buněčného cyklu.
Vaječník	Nádorové buňky	Injekce adenoviru s scFv protilátkou proti onkoproteinu ErbB2. Snaha o inaktivaci růstového signálu.
Maligní melanom	Tumor-infiltrující lymfocyty (TILs)	Extrakce TILs z tumoru a jejich pomnožení. Infekce TILs retrovirem s genem pro nekrotický faktor, který pak působí na okolní buňky v nádoru.
Různé nádory	Nádorové buňky	Transfekce nádorových buněk retrovirem exprimujícím povrchový antigen (HLA-B7) nebo cytokin (IL-12), což by mělo zvýšit imunogenicitu tumoru, takže jej imunitní systém snáze zničí.
Prostata	Dendritické buňky	Na autologní dendritické buňky se působí tumorovým antigenem nebo cDNA exprimující antigen aby zahájily imunitní odpověď vůči tumoru.
Maligní gliom (mozek)	Nádorové buňky	Injekce retroviru s TK do tumoru. Jsou infikovány jen rostoucí buňky. Je přidán gancyklovir, který TK-pozitivní buňky (tj. tumorové) mění na toxin a jsou tak samy selektivně usmrcovány



# Genová terapie nádorů

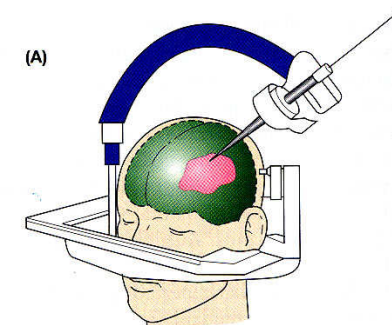
1. dodání genu: obnova funkce nádorových supresorových genů
2. inaktivace genu: zábrana exprese aktivovaného onkogenu
3. genetická manipulace: vyvolání apoptózy nádorových buněk
4. modifikace nádorové buňky tak, aby byla více antigenní a byla zničena imunitním systémem
5. modifikace dendritických buněk ke zvýšení nádorově-specifické imunitní odpovědi
6. použití geneticky upravených onkolytických virů selektivně usmrcujících nádorové buňky
7. genetická modifikace nádorových buněk zajišťující konverzi netoxického prekursoru na toxický produkt

## Příklady léčby nádorů pomocí genové terapie

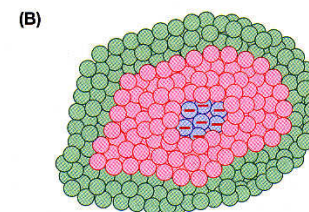
<b>Typ nádoru</b>	<b>Změněné buňky</b>	<b>Použitá strategie genové terapie</b>
Vaječník	Nádorové buňky	Intraperitoneální injekce retrovirů nebo adenovirů s genem p53 nebo BRCA1 – obnova kontroly buněčného cyklu.
Vaječník	Nádorové buňky	Injekce adenoviru s scFv protilátkou proti onkoproteinu ErbB2. Snaha o inaktivaci růstového signálu.
Maligní melanom	Tumor-infiltrující lymfocyty (TILs)	Extrakce TILs z tumoru a jejich pomnožení. Infekce TILs retrovirem s genem pro nekrotický faktor, který pak působí na okolní buňky v nádoru.
Různé nádory	Nádorové buňky	Transfekce nádorových buněk retrovirem exprimujícím povrchový antigen (HLA-B7) nebo cytokin (IL-12), což by mělo zvýšit imunogenicitu tumoru, takže jej imunitní systém snáze zničí.
Prostata	Dendritické buňky	Na autologní dendritické buňky se působí tumorovým antigenem nebo cDNA exprimující antigen aby zahájily imunitní odpověď vůči tumoru.
Maligní gliom (mozek)	Nádorové buňky	Injekce retroviru s TK do tumoru. Jsou infikovány jen rostoucí buňky. Je přidán gancyklovir, který TK-pozitivní buňky (tj. tumorové) mění na toxin a jsou tak samy selektivně usmrcovány

# Genová terapie in vivo

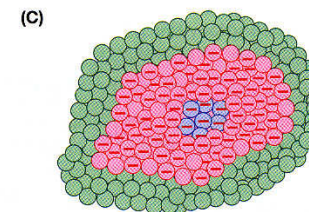
Do nádoru jsou injikovány buňky, do nichž byl *in vitro* vnesen retrovirový vektor, který obsahuje gen pro tymidinkinázu (TK). Vektor se uvolňuje a infikuje okolní nádorové buňky, v nichž se pak vytváří TK (retrovirus je schopen infikovat jen dělící se buňky!). Do těla pacienta je intravenózně podána netoxická látka gancyklovir (gcv), která je TK konvertována na toxický gcv-trifosfát usmrcující buňky.



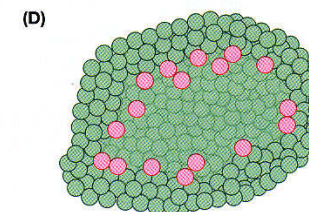
(A) MRI-guided stereotactic implantation of vector producer cells (VPC) into CNS tumors *in situ*



(B) Vector producing cells inside the tumor



(C) Retroviruses infect tumor cells but not normal cells



(D) Gancyclovir kills the infected cells

