



Genové inženýrství

Genové inženýrství se zabývá vytvářením pozměněných či nových genů a jejich zaváděním do organismů s cílem rekonstruovat jejich genetickou výbavu.

Metodickým základem genového inženýrství jsou manipulace s DNA *in vitro* (zejména klonování genů a jejich cílené úpravy). Cílené změny v genetické informaci lze provádět také *in vivo*.

Objevy, které umožnily cíleně manipulovat s DNA

- **restrikční endonukleázy a další enzymy**
 - rozštěpení DNA v přesně definovaném místě
 - spojení dvou cizorodých DNA (DNA z různých organismů)
 - syntéza DNA ve zkoumavce
- **sekvenování DNA**
 - stanovení molekulární struktury genu
- **klonování genů**
 - zavedení genu do nepříbuzných organismů
 - **(překonání mezidruhových barrier)**
 - pomnožení genu do neomezeného množství
 - cílené zavádění mutací do genu
 - studium projevu pozměněných genů (mutace → funkce)

Etapy vzniku a vývoje genového inženýrství

1965 - objev plazmidů

1970 - izolace prvního restrikčního enzymu

1972 - příprava prvních rekombinantních molekul DNA *in vitro*

1973 - začátek klonování genů

1975 - Asilomarská konference

1977 - první rekombinované molekuly DNA nesoucí savčí geny

1977 - sekvenování DNA

1978 - příprava lidského inzulínu v bakteriích
(od r. 1982 vyráběn komerčně)

**** mutageneze *in vitro* - proteinové inženýrství

**** příprava transgenních organismů (rostliny, živočichové)

1980 - genové terapie

1983 - objev a zavedení PCR

1997 - klonování živočichů

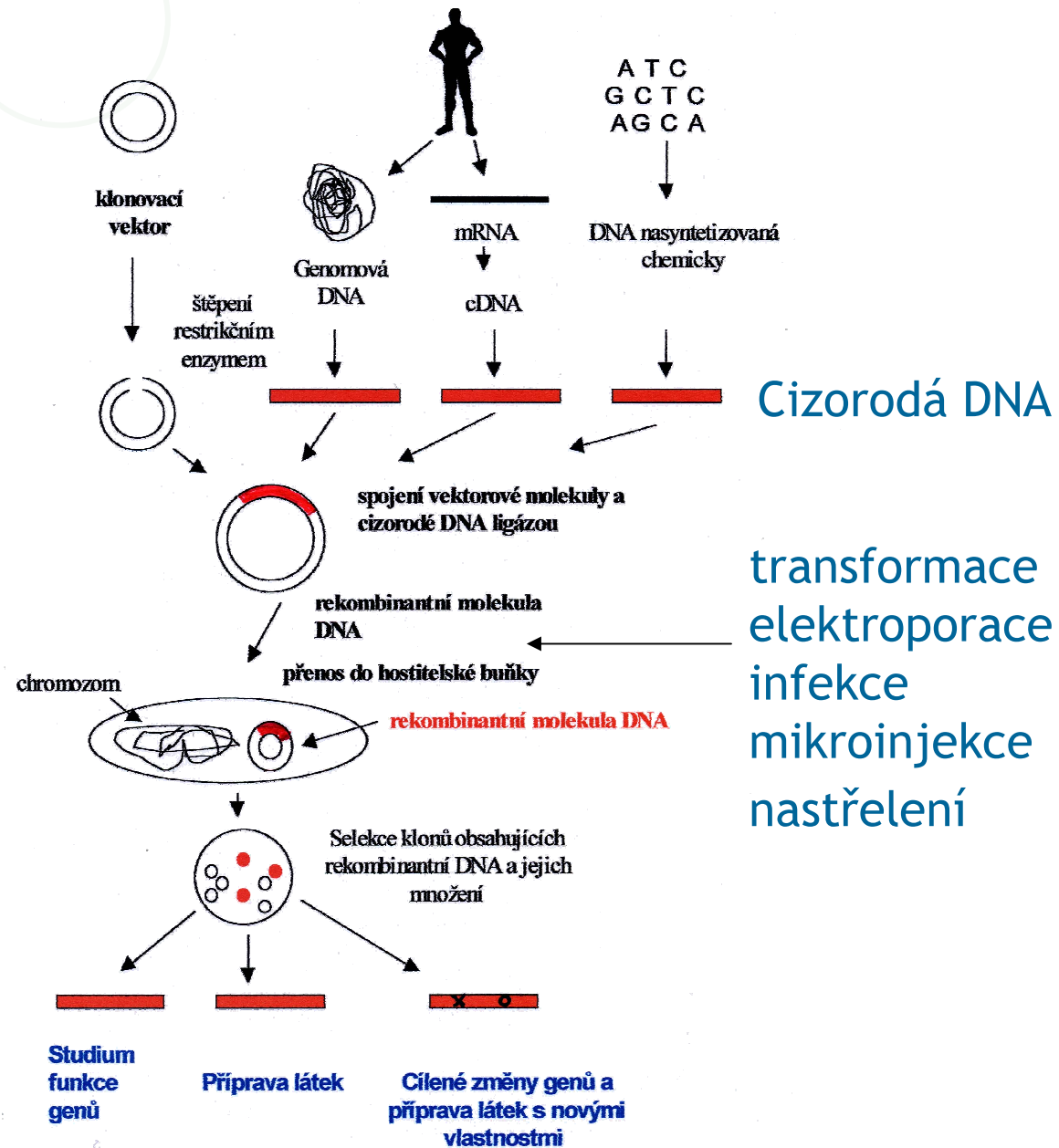
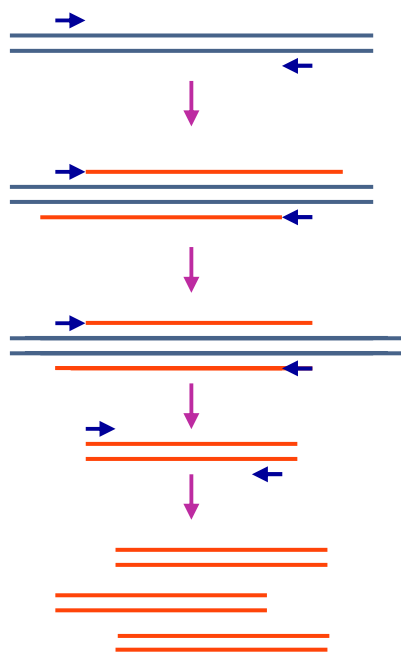
Po roce 2000: editace genomů - rekombinantní meganukleázy -

Využití genového inženýrství

- **Základní výzkum: studium struktury a funkce genů a genomů**
- **Praktické aplikace:**
 - **Příprava látek významných v lékařství, zemědělství a průmyslu**
 - vnášení cizorodých genů do nepříbuzných organismů a získávání produktů ve velkém množství - *překonání reprodukčních bariér*
 - **Příprava látek s novými vlastnostmi** pozměňováním stávajících nebo vytvářením nových genů - *enzymy, protilátky, vakcíny aj.*
 - **Pozměňování a zlepšování vlastností organismů**
 - 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)
 - **Genová terapie** - léčba genetických chorob

Klonování genů pomocí vektorů

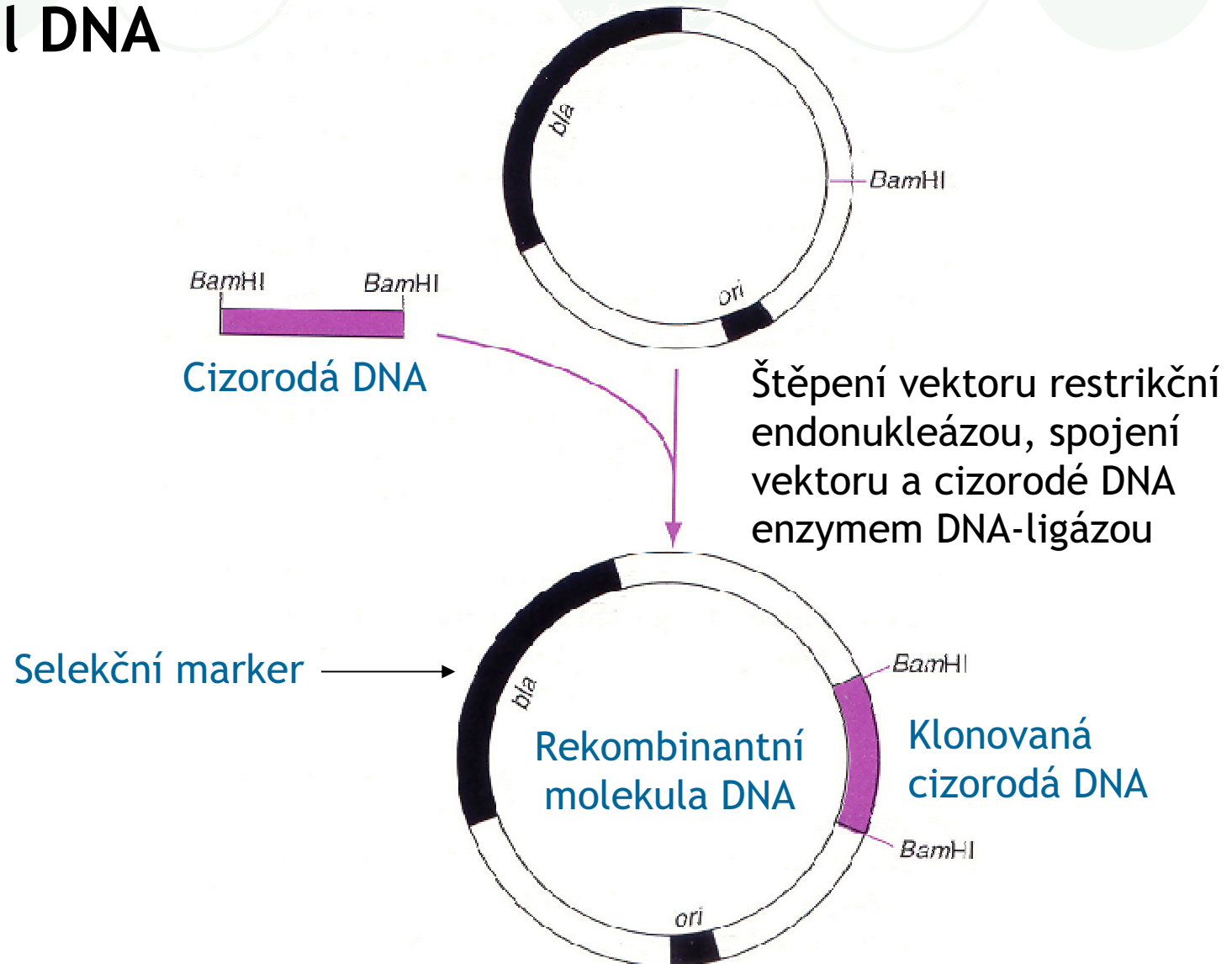
Klonování genů pomocí PCR



Cizorodá DNA

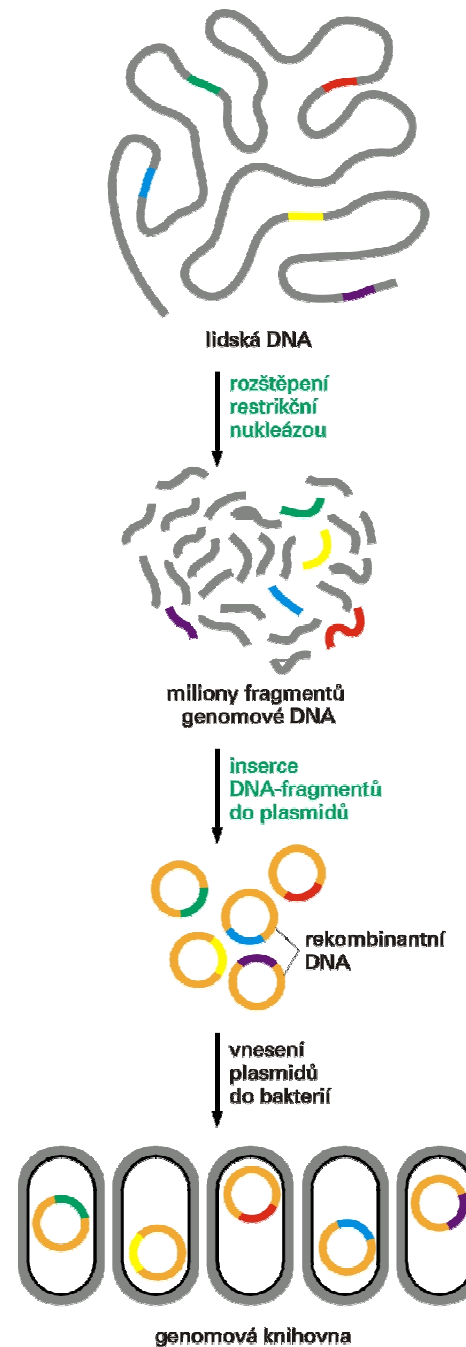
transformace
elektroporace
infekce
mikroinjekce
nastřelení

Příprava rekombinantních molekul DNA



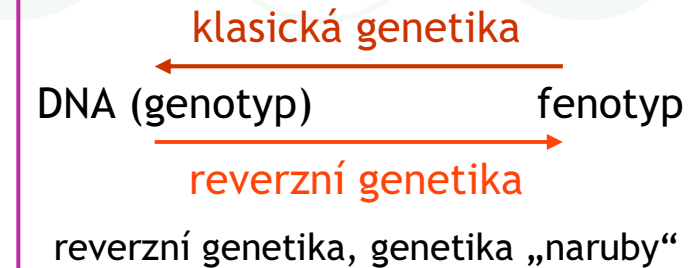
Konstrukce (lidské) genomové knihovny

Soubor klonovaných fragmentů genomové DNA, které dohromady reprezentují celý genom příslušného organismu.



Mutageneze *in vitro*

site-directed mutagenesis
místně cílená (řízená) mutageneze
lokalizovaná mutageneze



Mutace se vnášejí do izolované DNA (= *in vitro*)

typy mutací: **substituce, delece, inserce**

Cíle: analýza vztahu mezi strukturou a funkcí NK

- Objasnění funkce genů a regulačních oblastí
- Cílení změny aminokyselin v proteinech
- Příprava proteinů s novými vlastnostmi (proteinové inženýrství)
- Příprava transgenních organismů

Mutagenese *in vitro*

Mutagenese *in vitro*

náhodná

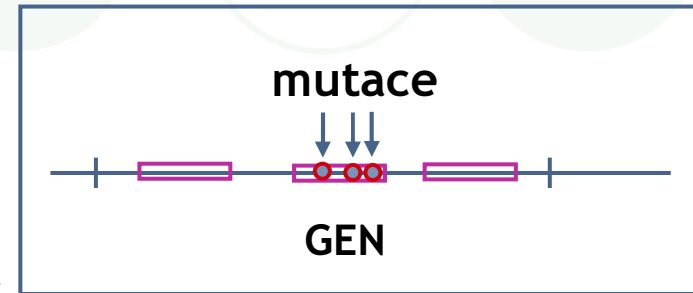
manipulace s restričními místy
inzerce linkerů
chemická mutagenese
inkorporace chybných bází

vyhledání genu nebo
funkčních oblastí na DNA

cílená

oligonukleotidová mutagenese
(umístění do konkrétního místa)
syntéza genů
(kasetová mutagenese)

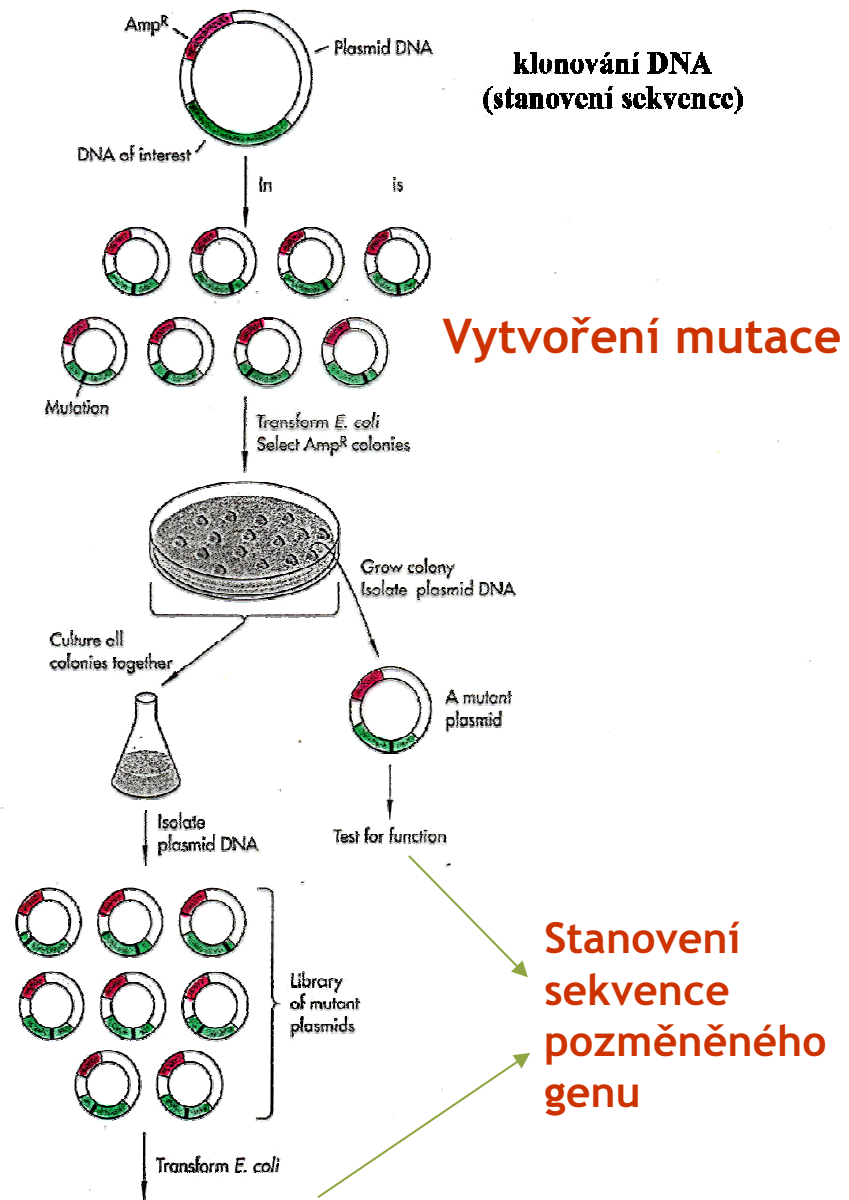
záměny bází nebo kodonů
cílené změny struktury
proteinů



Způsoby používané při mutagenезi in vitro

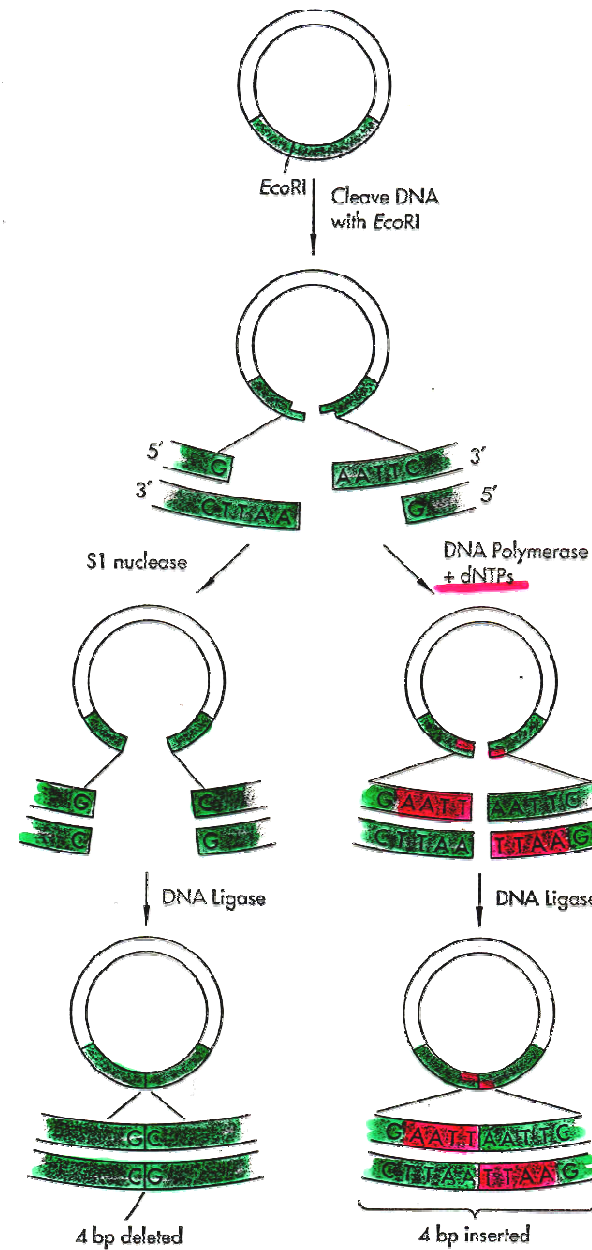
1. Manipulace s restričními místy a enzymatické úpravy DNA
2. Oligonukleotidová mutagenезe (extenze primeru)
3. Chemická mutagenезe
4. Kazetová mutagenезe
5. Metody založené na PCR
6. Mutagenезe pomocí supresorových tRNA

Obecná strategie při mutagenезi *in vitro*



Testování funkce pozměněného genu

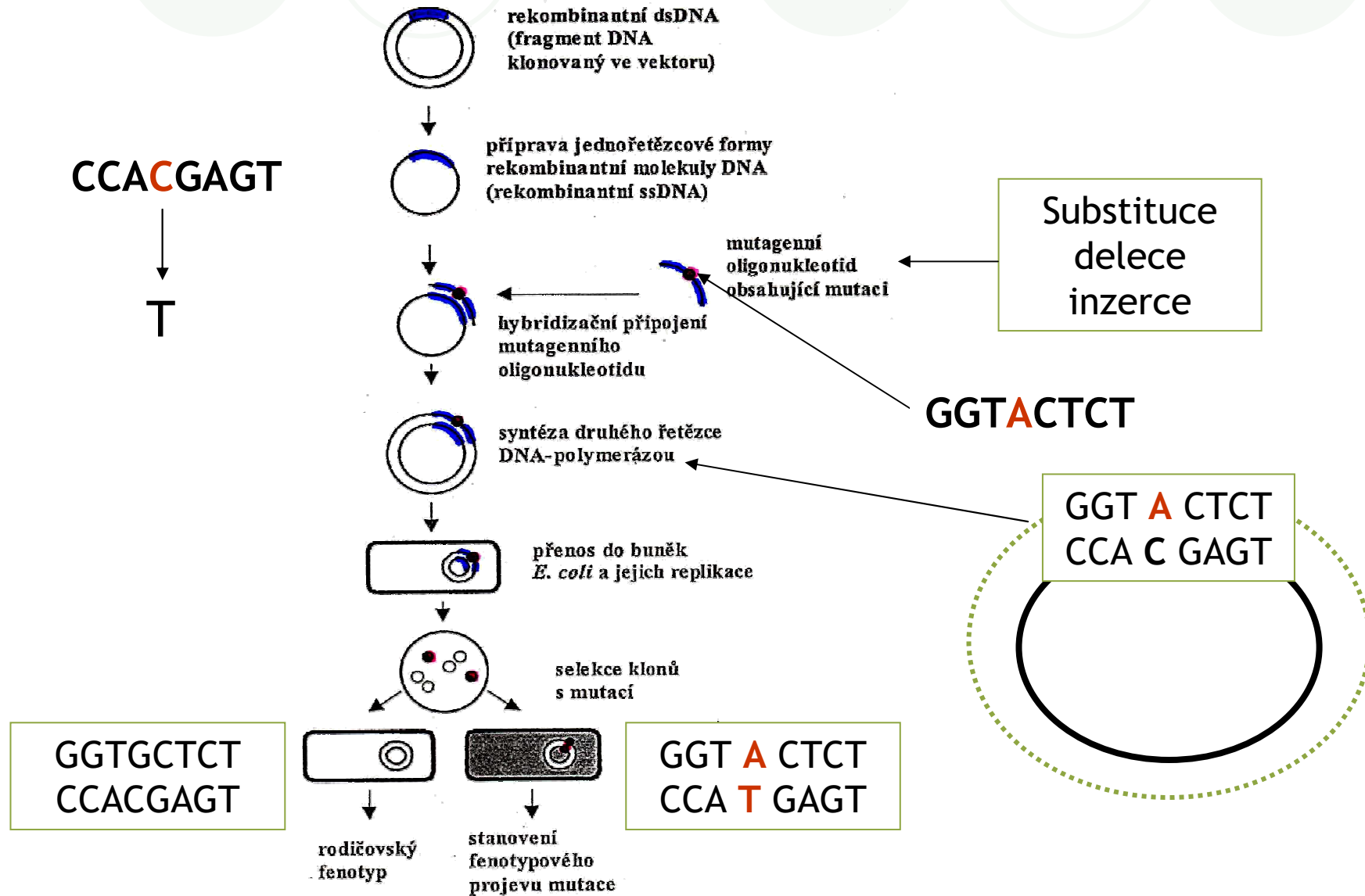
Vytváření mutací v restričním místě



- exonukleáza
- výběr dNTP

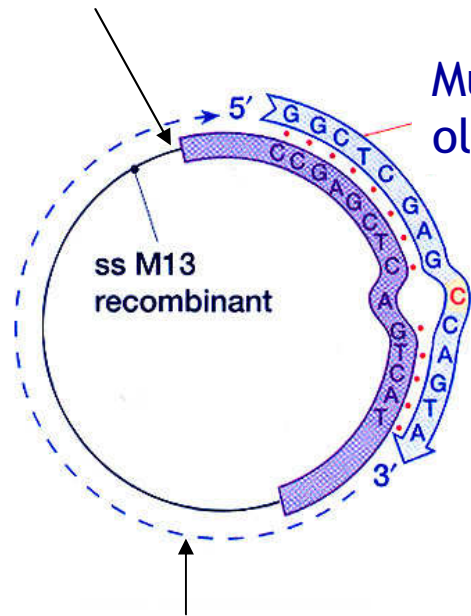
Vytváření inzercí nebo
delecí v sekvenci genu

Mutageneze pomocí mutantních oligonukleotidů



Mutagenese pomocí mutagenních oligonukleotidů

Rodičovská
(nemutantní) DNA



Nově syntetizovaná
(mutantní) DNA

Mutagenní
oligonukleotid

Nově syntetizovaná
mutantní DNA

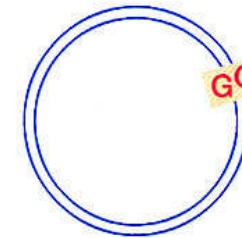
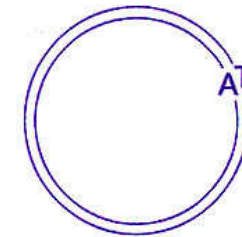


Dvojřetězcová
heteroduplexní DNA

Přenos do E.
coli

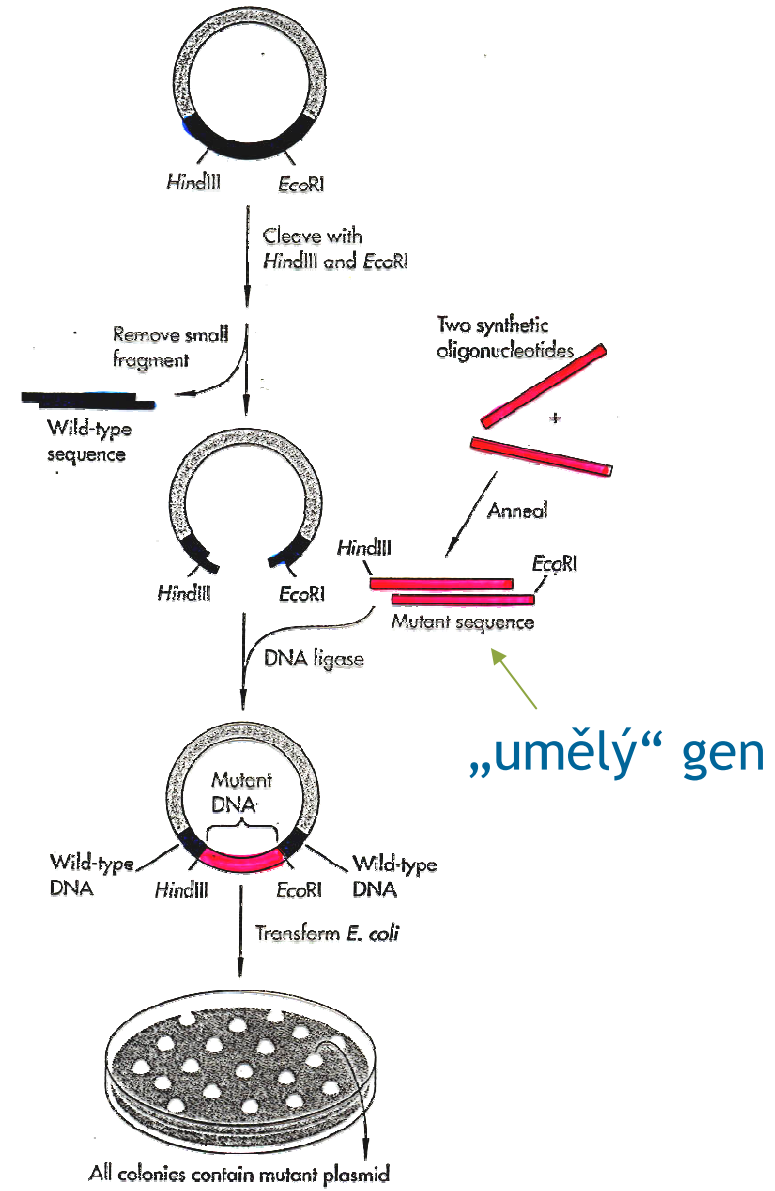


rodičovský homoduplex

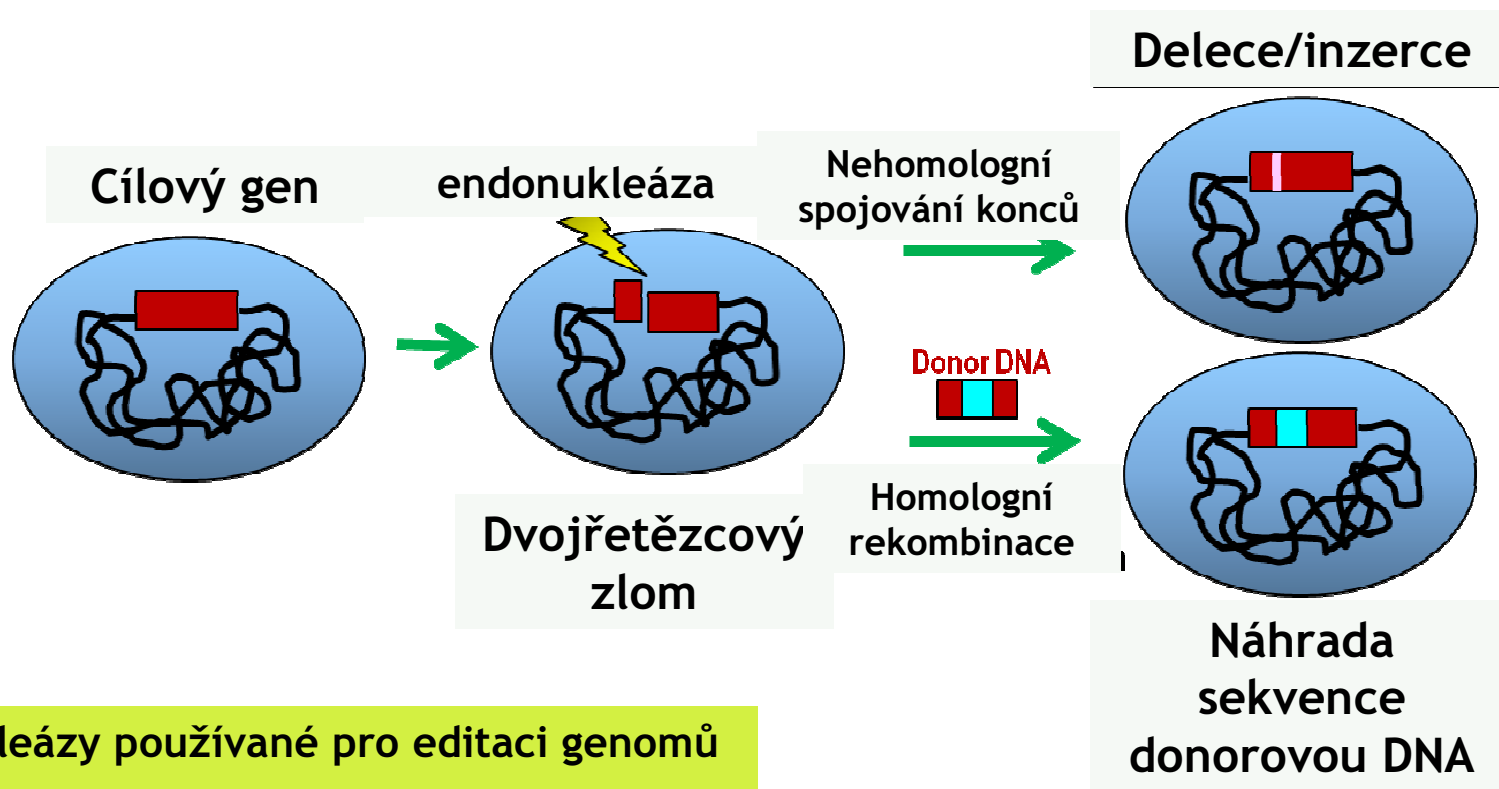


mutantní homoduplex

Kazetová mutace



Editace genomů (chromosome engineering)



Nukleázy používané pro editaci genomů

- Meganukleázy
- ZNF
- TALEN
- CRISPR/Cas



Editace genomů

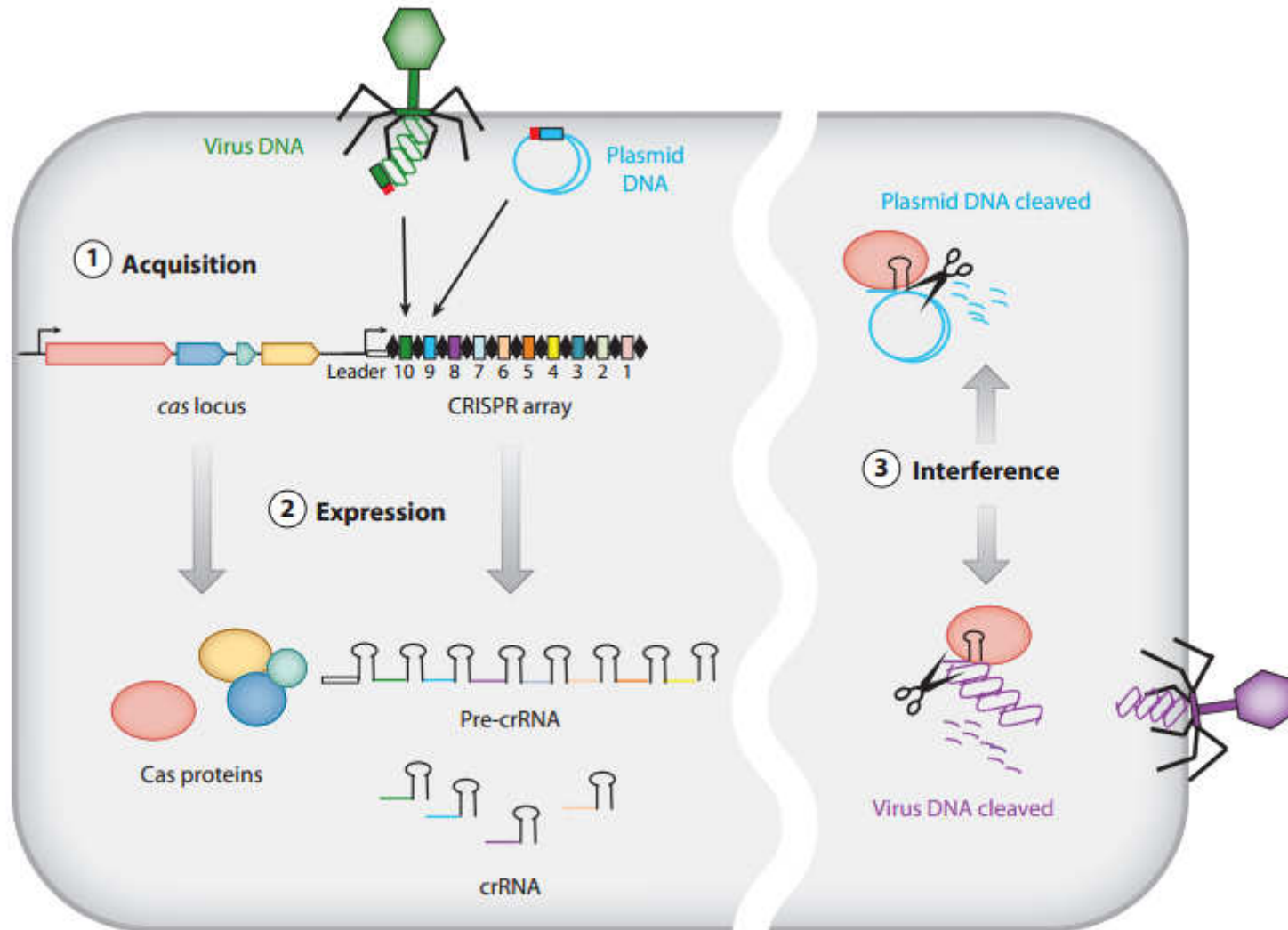
Genome editing, or genome editing with engineered nucleases (GEEN)

Postupy genového inženýrství, při nichž se do vybraného místa v cílové DNA pomocí uměle připravených nukleáz (tzv. molekulárních nůžek) vnáší inserce, delece a nebo se stávající sekvence nahrazuje za jiné (náhrada alel).

Tyto nukleázy vytvářejí na určených místech genomu dvouřetězcové zlomy (DSBs: double-stranded breaks), čímž vyvolávají přirozené endogenní buněčné procesy vedoucí k reparaci zlomů:

- a) Homologní rekombinací (HR) HDR = homology directed recombination
- b) Nehomologní spojování volných konců (NHEJ: nonhomologous end-joining)

System CRISPR/Cas



Proteinové inženýrství



Cíl: změna struktury a funkce proteinů prostřednictvím technologie rekombinantní DNA

- změny vazebných oblastí proteinů
- termostabilita
- rychlost a substrátová specifita reakcí
- citlivost k oxidaci a toxickým látkám

Předpoklady pro vytváření funkčních proteinů klonovaných genů v nepříbujných organismech

1. Transkripce genu

- přítomnost funkčních regulačních oblastí pro transkripci
- promotor, terminátor

2. Translace přepisu genu

- přítomnost signálů pro translaci
- SD, iniciační a terminační kodon
- výběr kodonů pro tRNA daného organismu

3. Posttranslační modifikace

4. Transport proteinu

- signální sekvence funkční v daném hostiteli

Zajištění exprese cizorodých genů

bakteriální gen

eukaryotický gen



Hybridní (chimerický) gen



cDNA

Syntéza DNA *de novo*

Fúzní protein



štěpení, purifikace

zralý protein



prokaryotická část eukaryotická část

Gen pro inzulin DNA



Transkripce



pre-mRNA



Sestřih



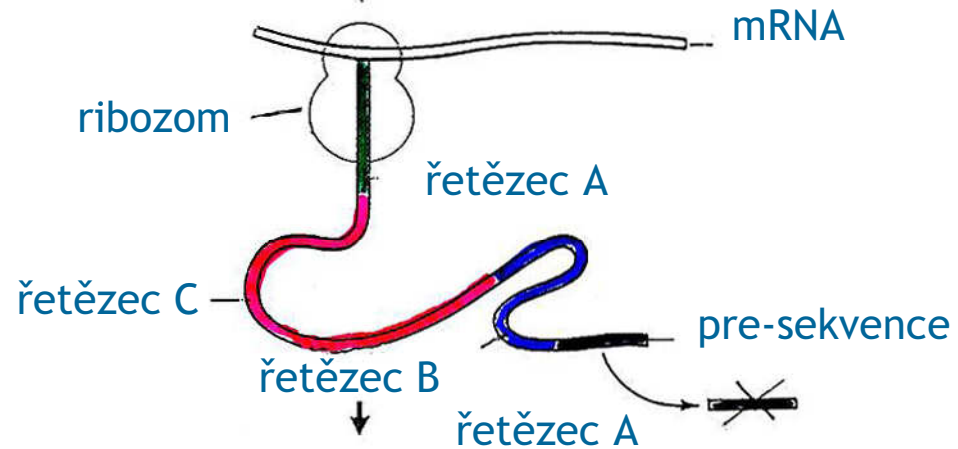
mRNA pro pre-proinzulin



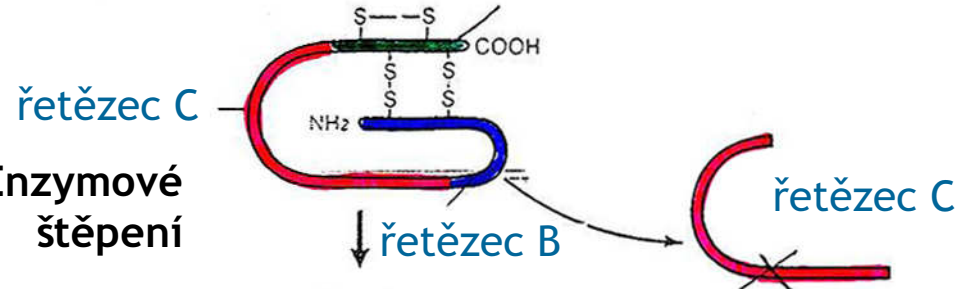
Translace



pre-proinzulin (preprohormon)



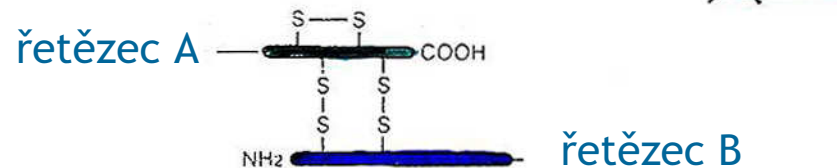
proinzulin (prohormon)



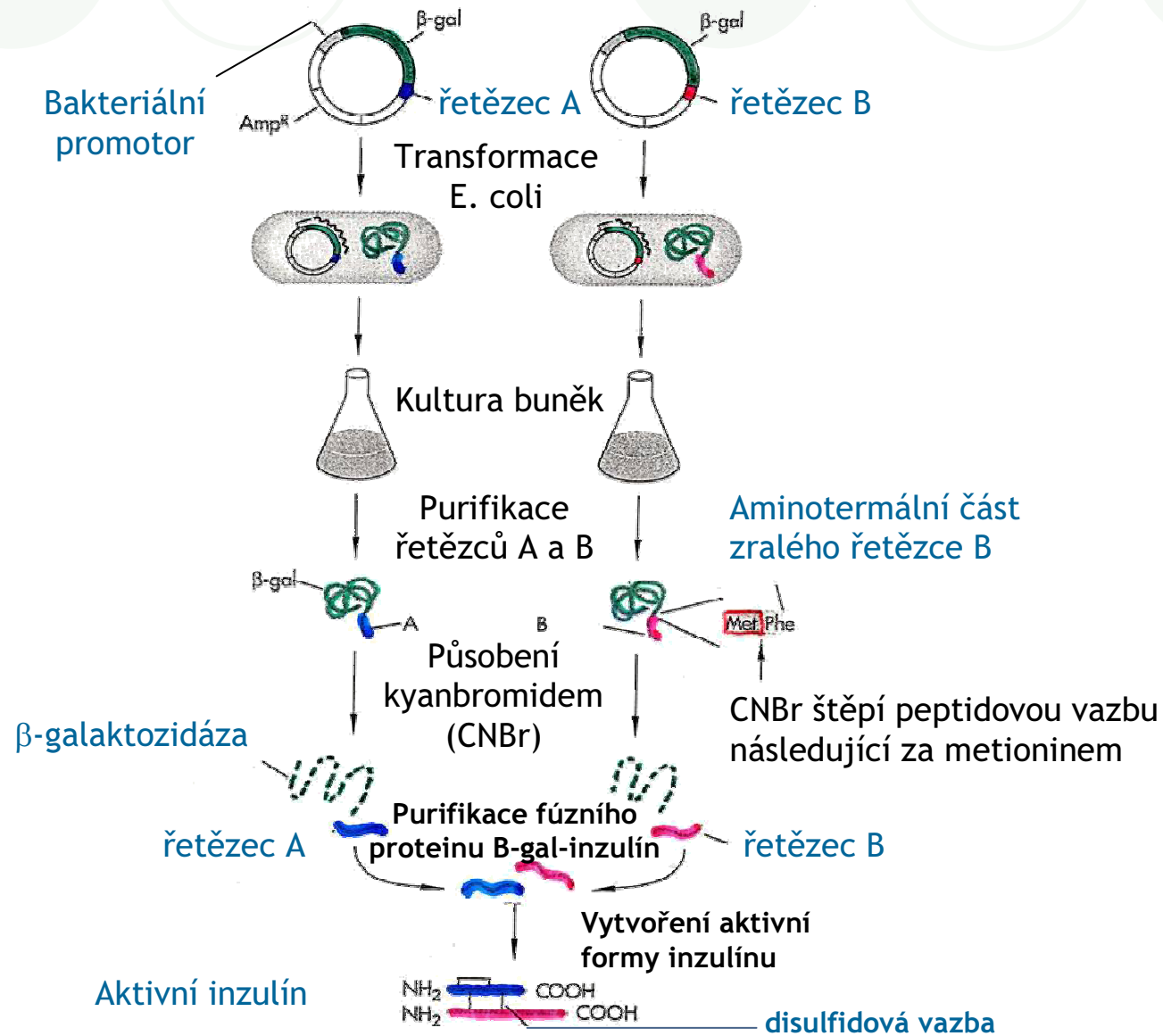
Enzymové štěpení



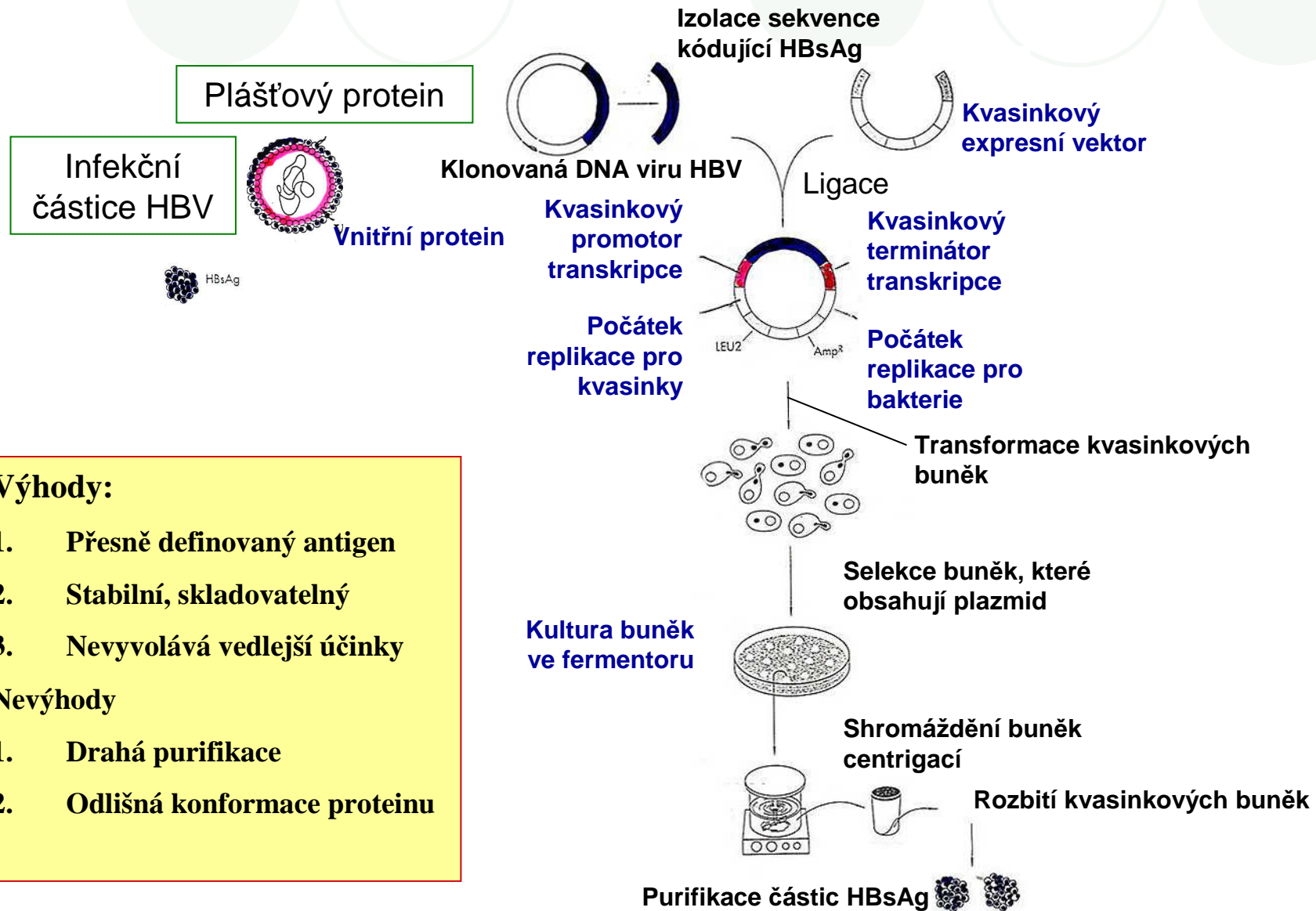
aktivní inzulin (zralý hormon)



Příprava lidského inzulinu v bakteriálních buňkách



Příprava podjednotkové vakcíny viru hepatitidy B (HBV) ve kvasinkách



Výhody:

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

Nevýhody

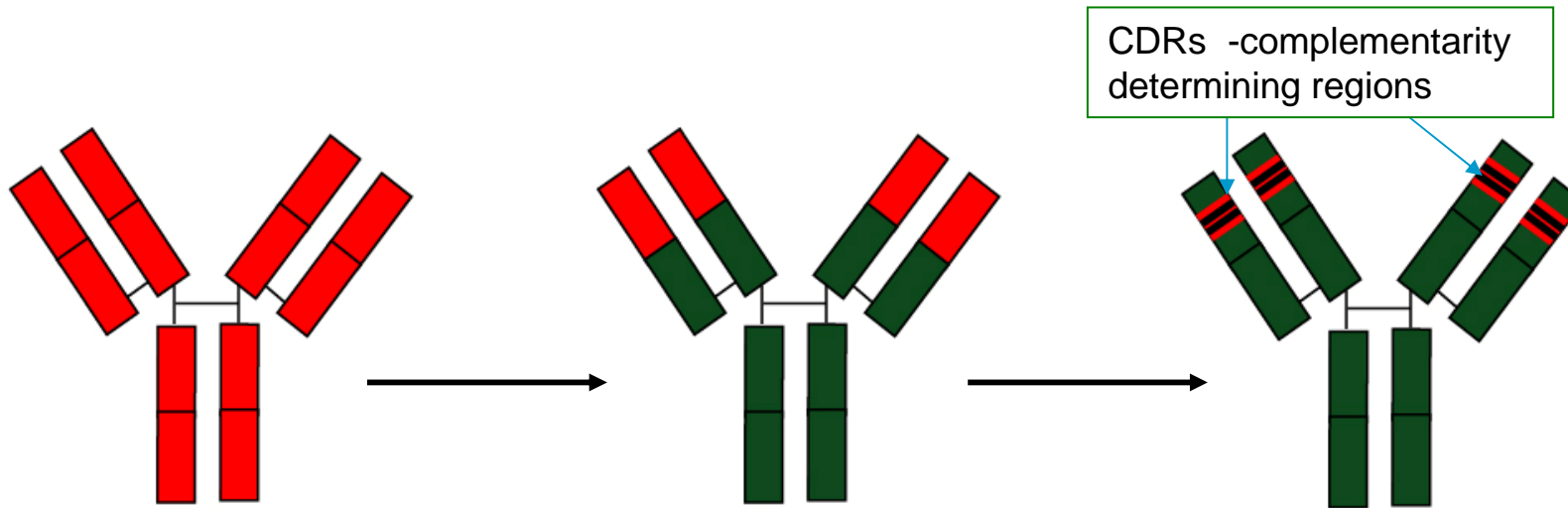
1. Drahá purifikace
2. Odlišná konformace proteinu

Příprava humanizovaných protilátek

Myší protilátka

Chimerická protilátka

Humanizovaná protilátka



Variabilní, konstantní a hypervariabilní oblasti jsou z protilátek myši

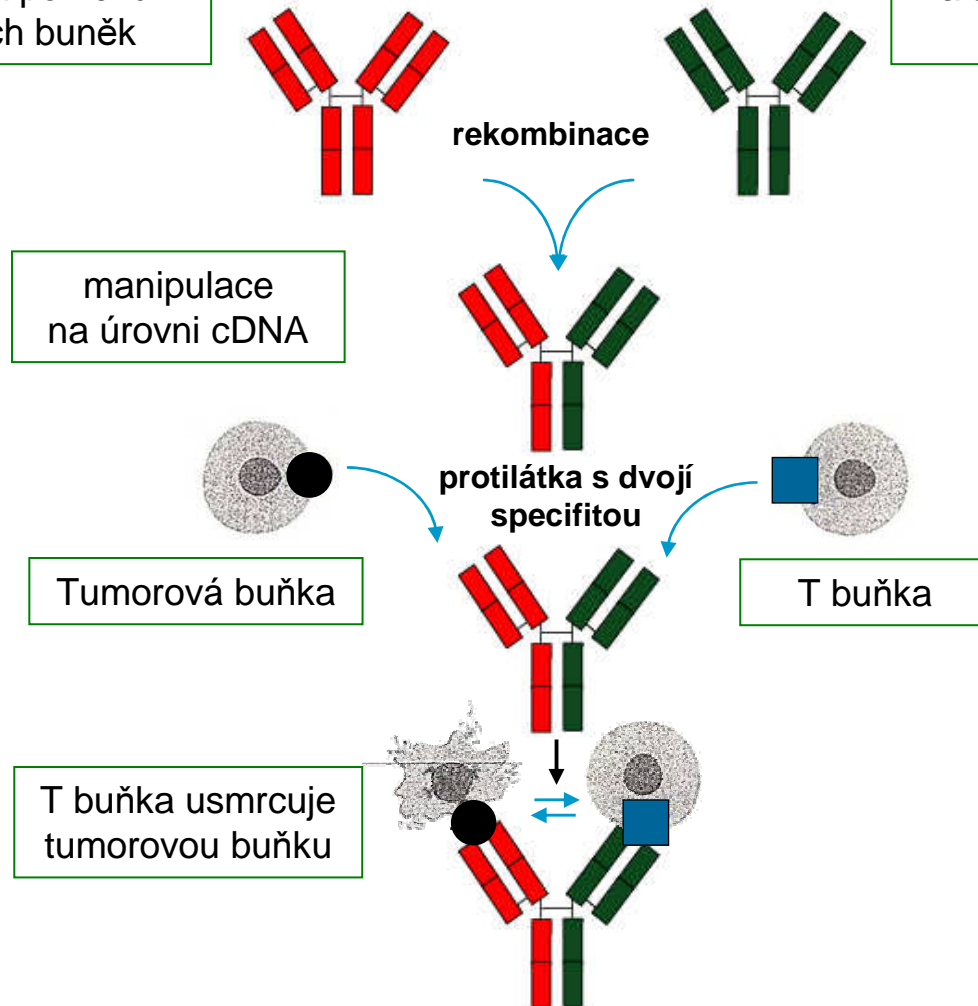
Konstantní oblast je z lidské protilátky, variabilní a hypervariabilní oblasti jsou z myši

Hypervariabilní oblasti jsou z myších protilátek, ostatní jsou lidské

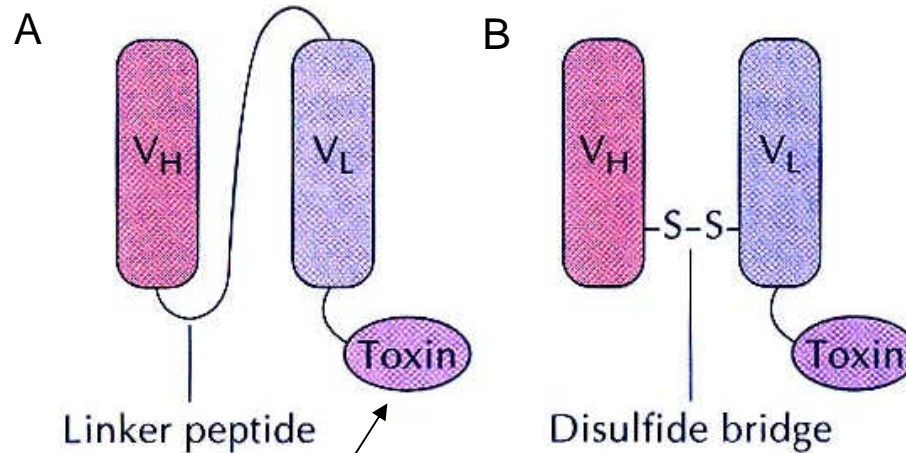
Protilátka s dvojí specifitou

Protilátka vázající se na antigeny na povrchu tumorových buněk

Protilátka vázající se na antigen na povrchu T buněk



Jednořetězcové protilátky a imunotoxiny



- exotoxin A *Pseudomonas*
- difterický toxin
- ricin

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

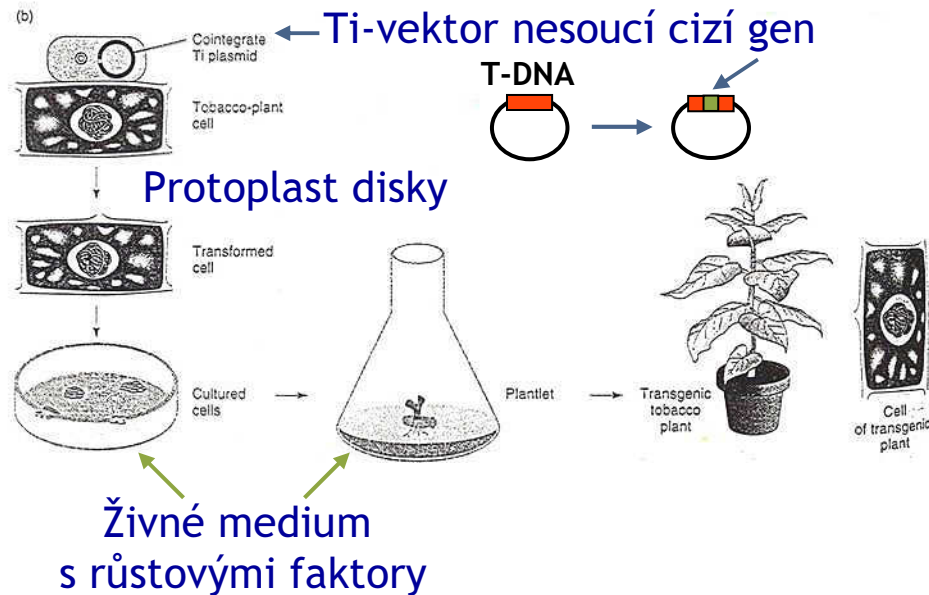
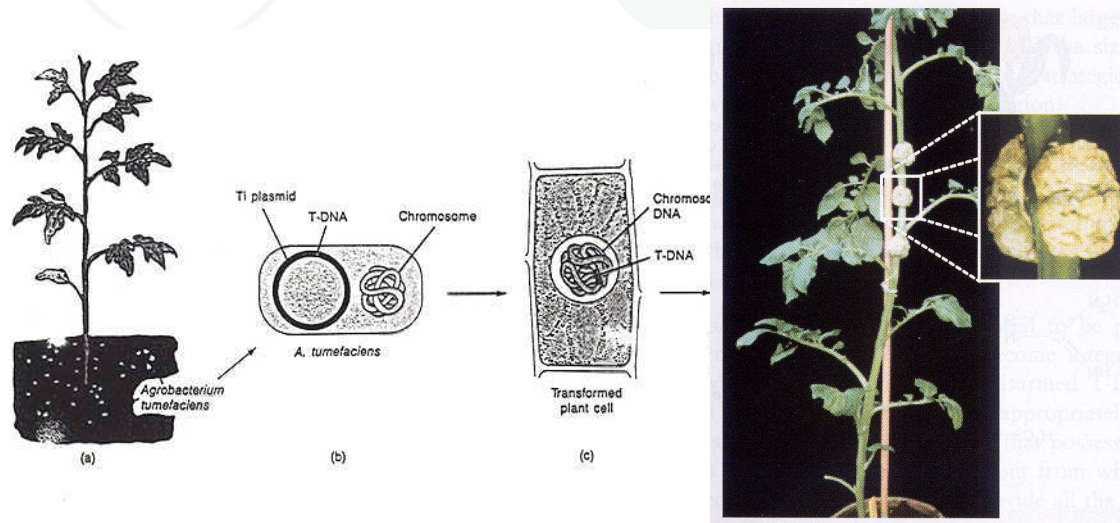
Záměna peptidového linkeru za disulfidický můstek několikanásobně zvyšuje stabilitu scFv a tím zlepšuje jeho terapeutické využití

Např. fúzní protein
HER2-Ig + exotoxin *Pseudomonas*

human epidermal growth factor receptor 2 -Approximately 30% of breast cancers have an amplification of the *HER2/neu* gene or overexpression of its protein product.

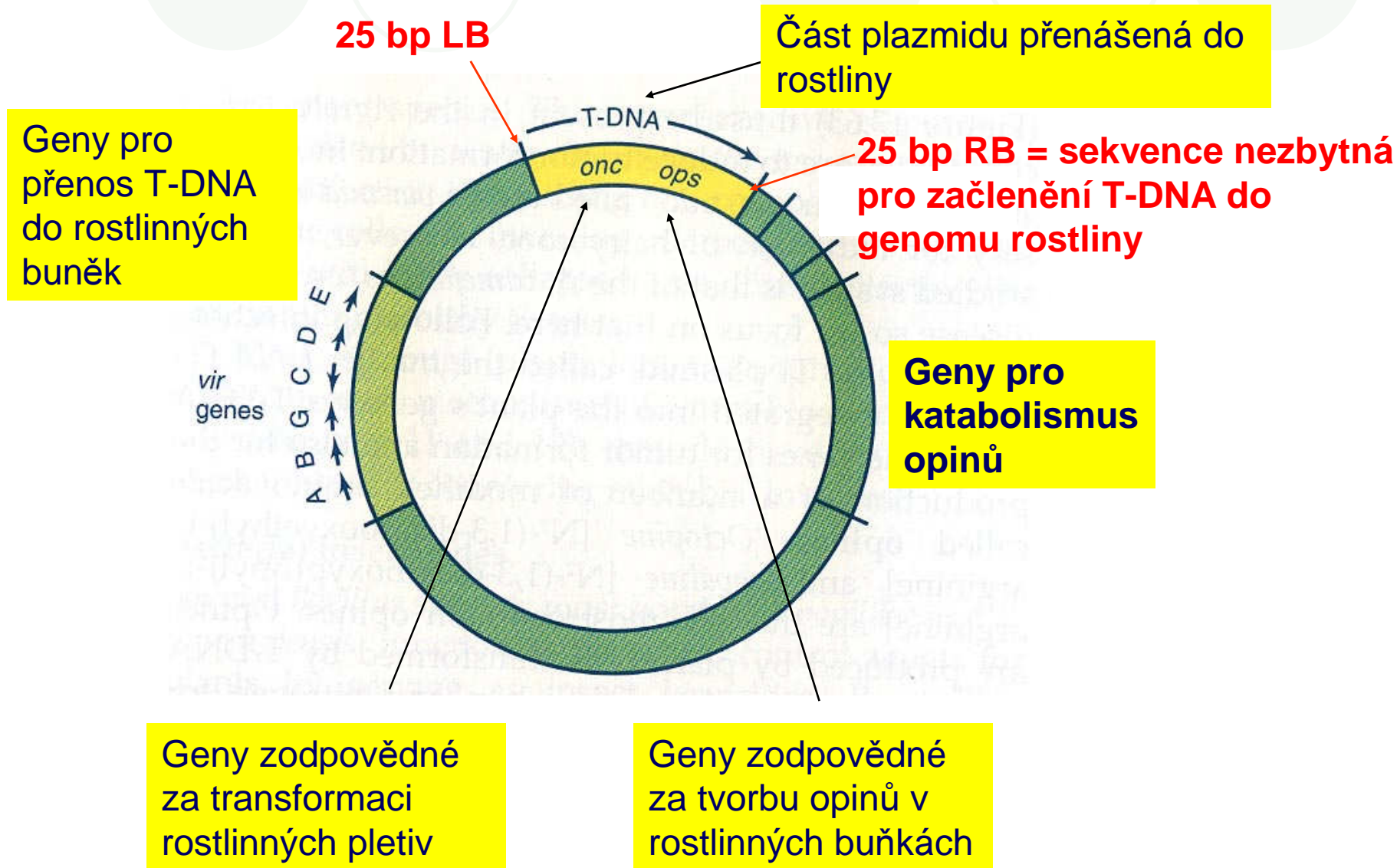
Pbs21 (plasmodium) + Shiva-1

Přenos cizích genů do rostlin pomocí Ti-plazmidu

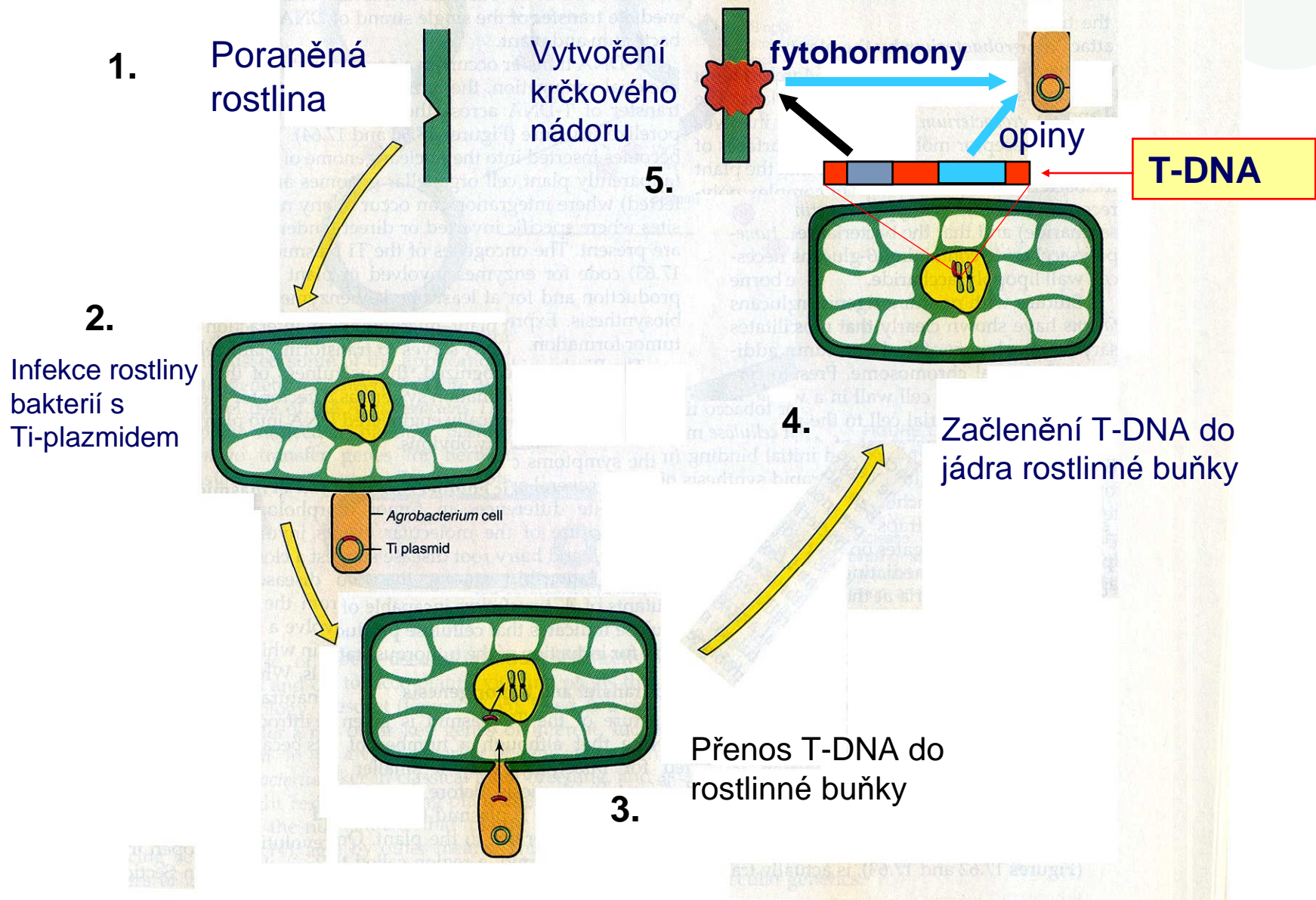


Transgenní
rostlina
přenášející
geny do
potomstva

Struktura Ti-plazmidu *A. tumefaciens*



Transformace rostlin navozená Ti-plazmidem *Agr. tumefaciens*



Využití genového inženýrství u rostlin

A. Potravin y a krmiva

- **Ovlivňování agronomických vlastností**
 - Rezistence k herbicidům
 - Rezistence k patogenům (hmyzu, virům, plísním apod.)
 - Tolerance ke stresům (vodní stres – sucho, mráz; osmotický stres – zasolení půd)
- **Modifikace posklizňových vlastností**
 - Prodloužení skladovatelnosti
 - Zpomalení zrání a navození rezistence k skládkovým chorobám
 - Vylepšování nutriční hodnoty a chuti

Využití genového inženýrství u rostlin

B. Produkce sekundárních metabolitů

- Studium a přenos genů pro klíčové enzymy biosyntetických drah
- Farmakologické přípravky

C. Technické plodiny

- Produkce škrobu a olejů pro průmyslové využití
- Biodegradovatelné plasty

D. Fytoremediace

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 hmyzím škůdcům

- Vnesení genu pro endotoxin z **Bacillus 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

Transgenní rostliny

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

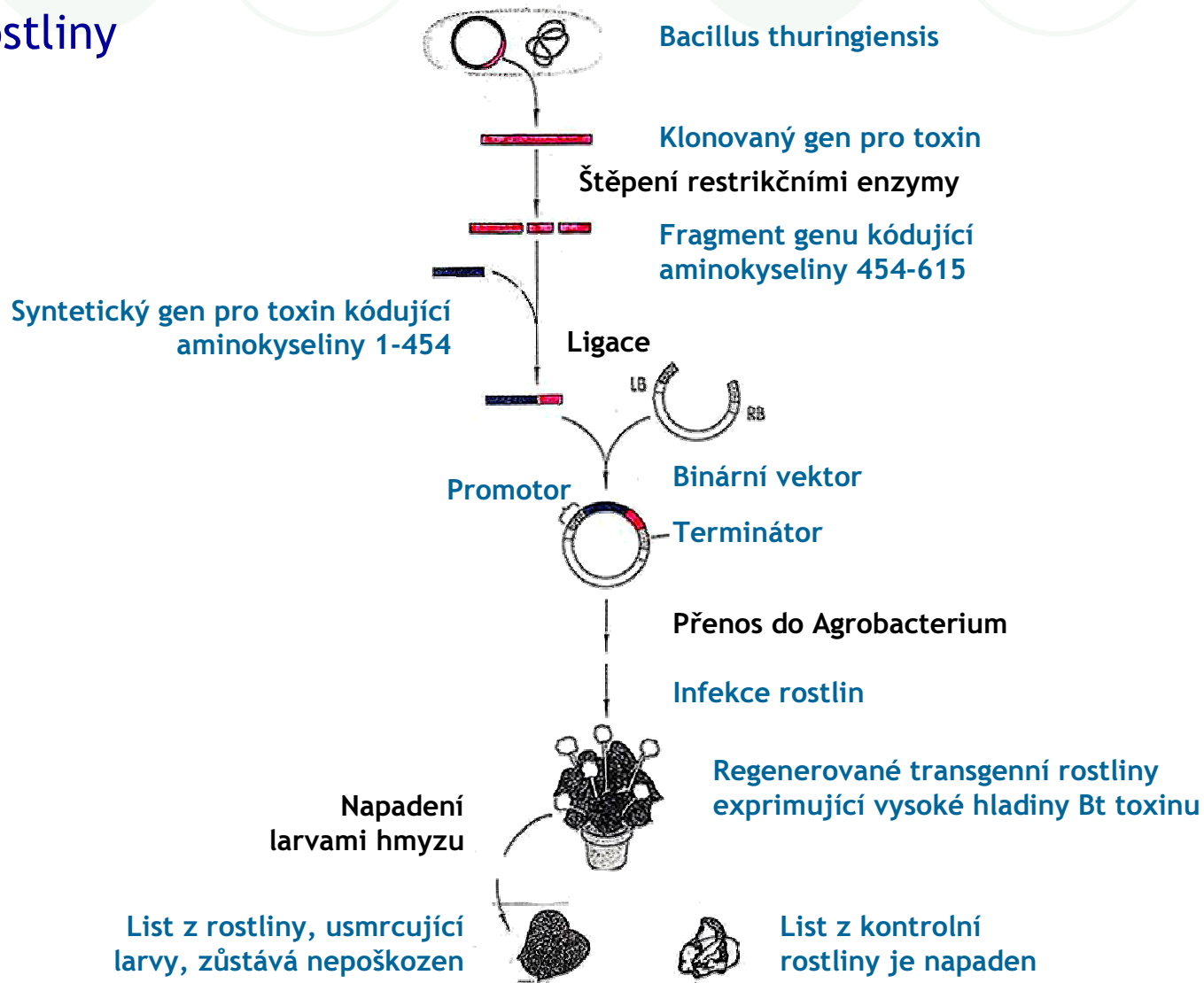
- Rajče FlavrSavr fy Calgene – transgen: antisense mRNA genu pro polygalakturonidasu – prodloužená konzumní zralost
- Rýže – vhodná pro alergiky
- Řepka – olej ze semen obsahující zvýšený podíl kys. Laurové (mýdla a detergenty)
- Řepka – olej ze semen bohatý na myristát (kosmetika) nebo kys. eruková (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 („jedlé vakcíny“)

- Syrová zelenina obsahující antigen (vakcínu), který indukuje tvorbu imunoglobulinů mukózního imunitního systému v zažívacím traktu
 - Povrchový antigen viru hepatitidy B
 - Podjednotka B toxinu cholery

Rostliny rezistentní k hmyzím škůdcům

Bt-rostliny



Transgenní BT-kukuřice

Obsahuje navíc dva až tři geny:

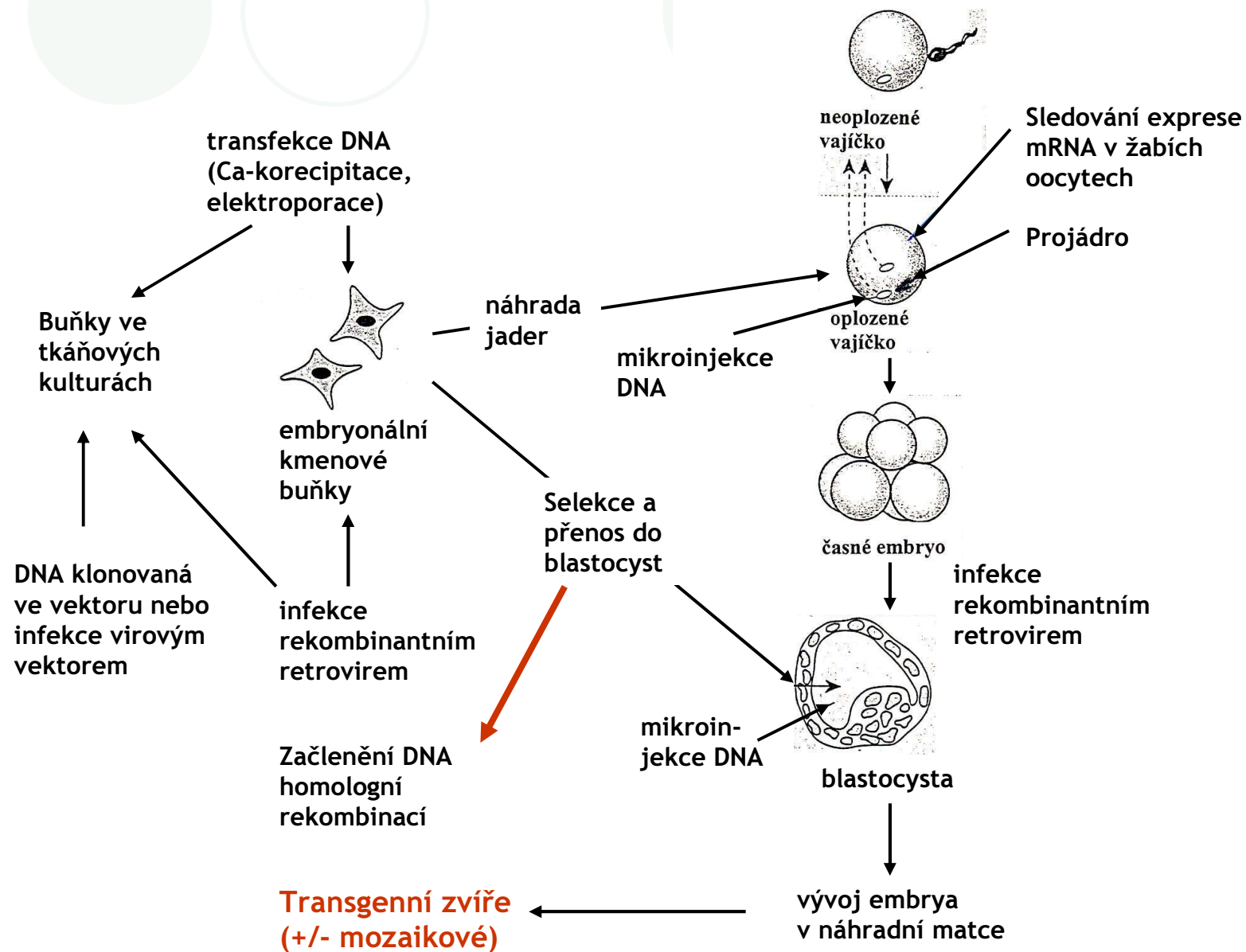
1. Gen(y) podmiňující **odolnost rostlin proti hmyzím škůdcům** (bakteriální gen z *Bacillus thuringiensis* zodpovědný za tvorbu deltatoxinu, který je jedovatý pro některé skupiny hmyzu, ale zcela neškodný pro savce a člověka)
2. Gen pro **odolnost vůči herbicidu Basta** (jeden z nových herbicidů, který 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.

Místo rezistence k antibiotikům jiné selekční systémy

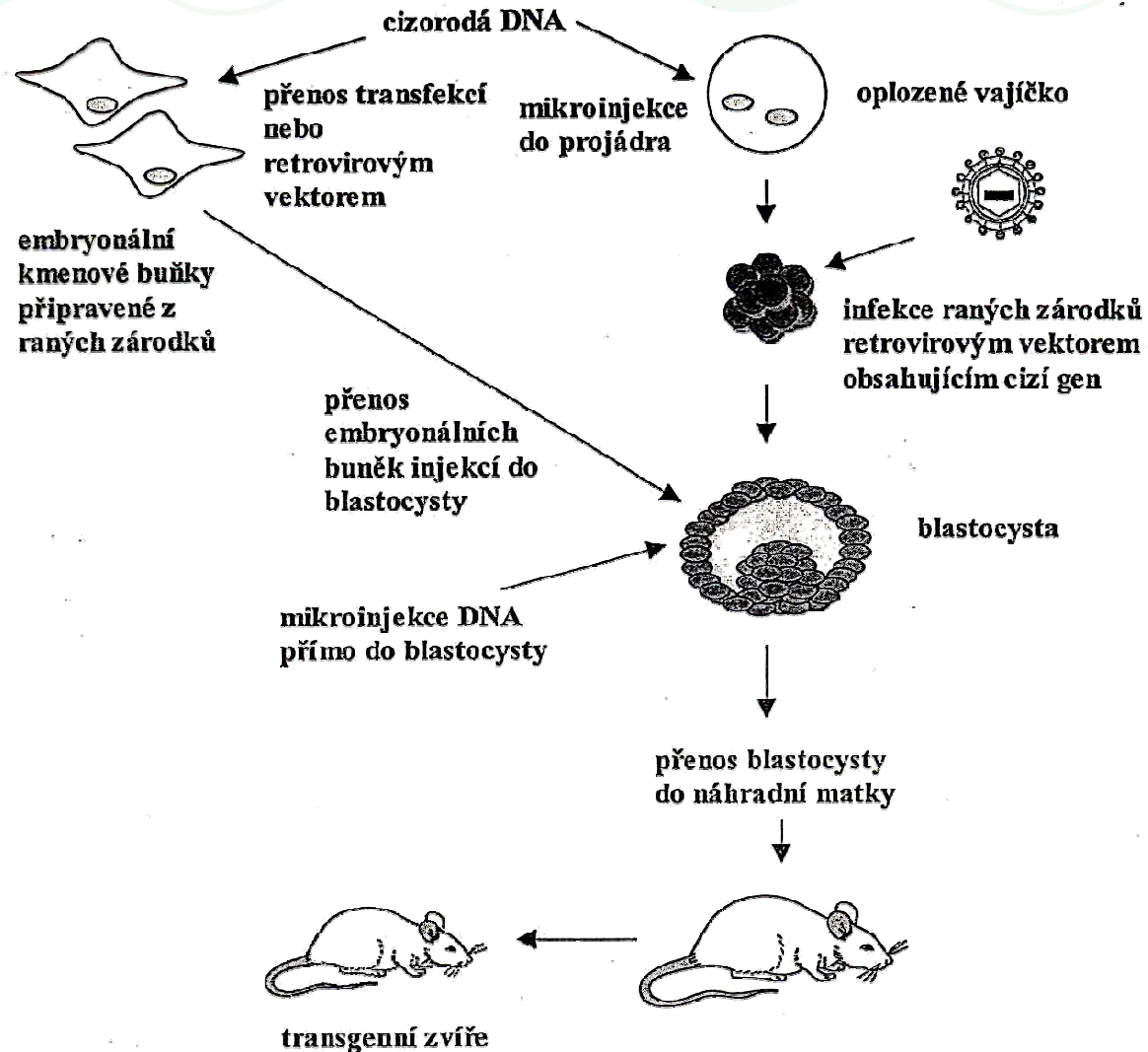
Cíle studia přenosu genů do živočišných buněk

- 1. Studium funkce genů a způsobu jejich regulace**
- 2. Příprava transgenních organismů**
 - studium fungování genů v rámci celého organismu
 - příprava živočichů s cíleně upravenými geny
 - modely pro studium genetických chorob
 - příprava zvířat s lepšími užitkovými vlastnostmi,
 - vytváření cizorodých proteinů
 - hledání možností pro genovou terapii

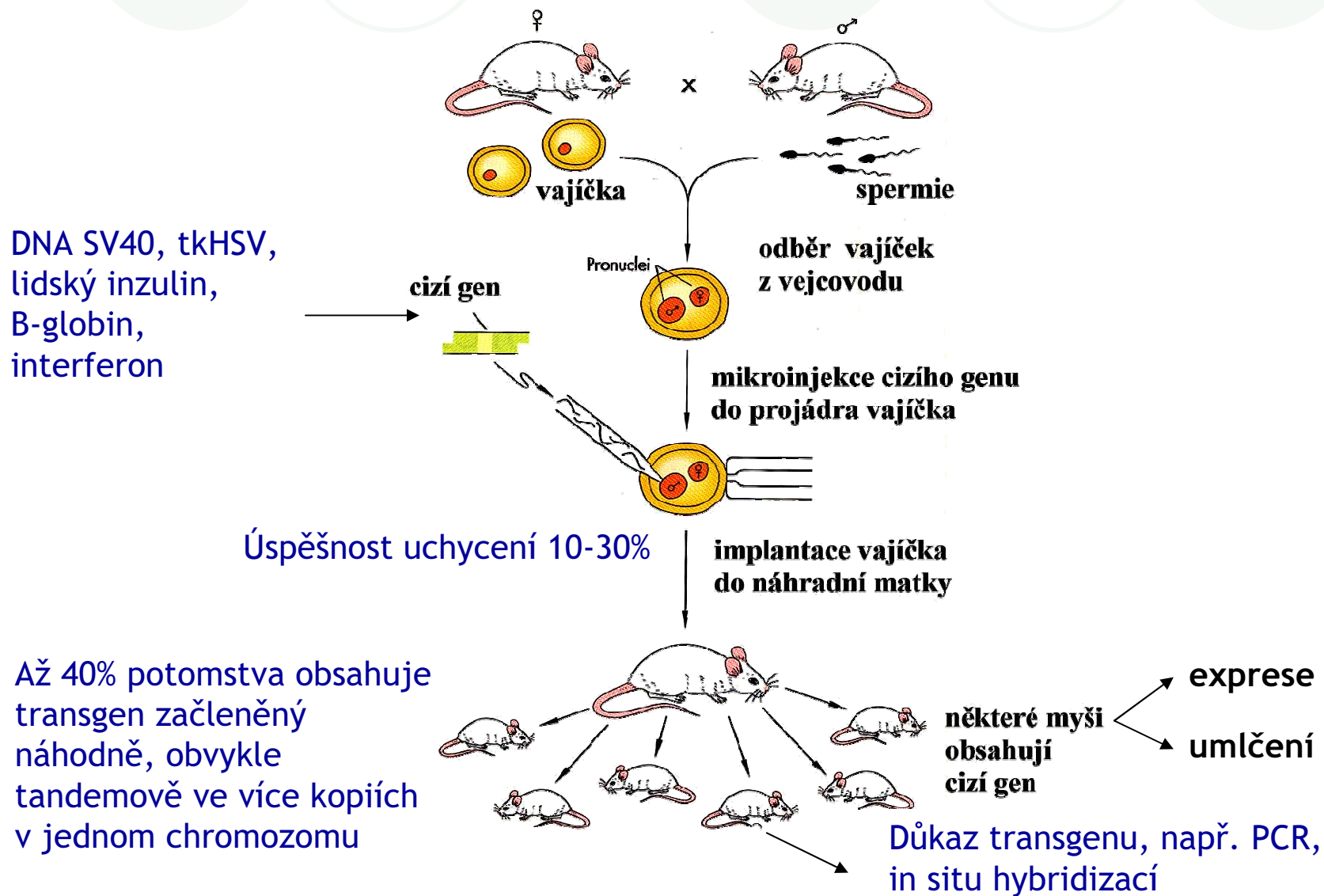
Způsoby přenosu cizích genů do savčích buněk



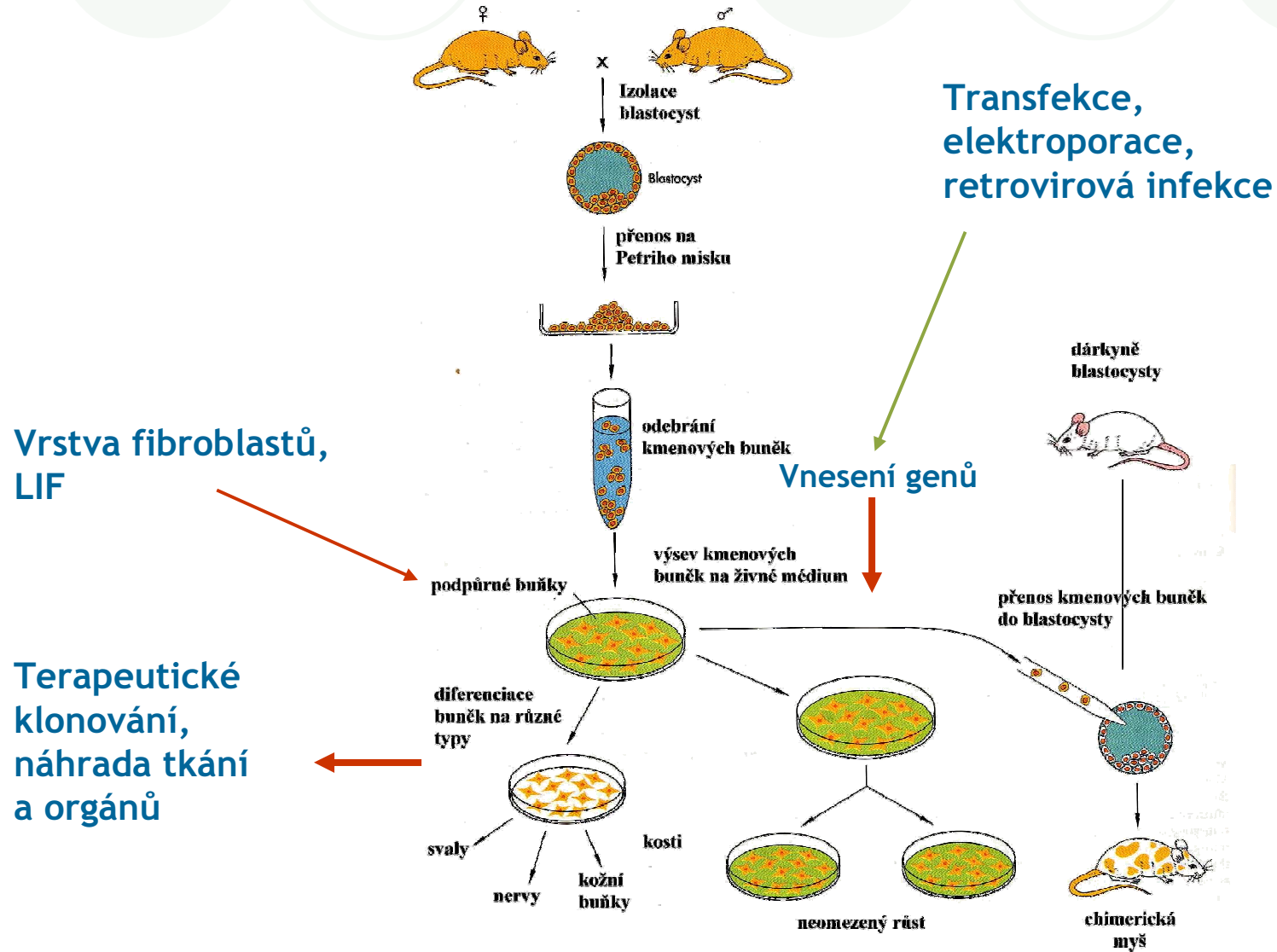
Příprava transgenních savců



Vytváření transgenních myší mikroinjekcí cizího genu do oplozeného vajíčka



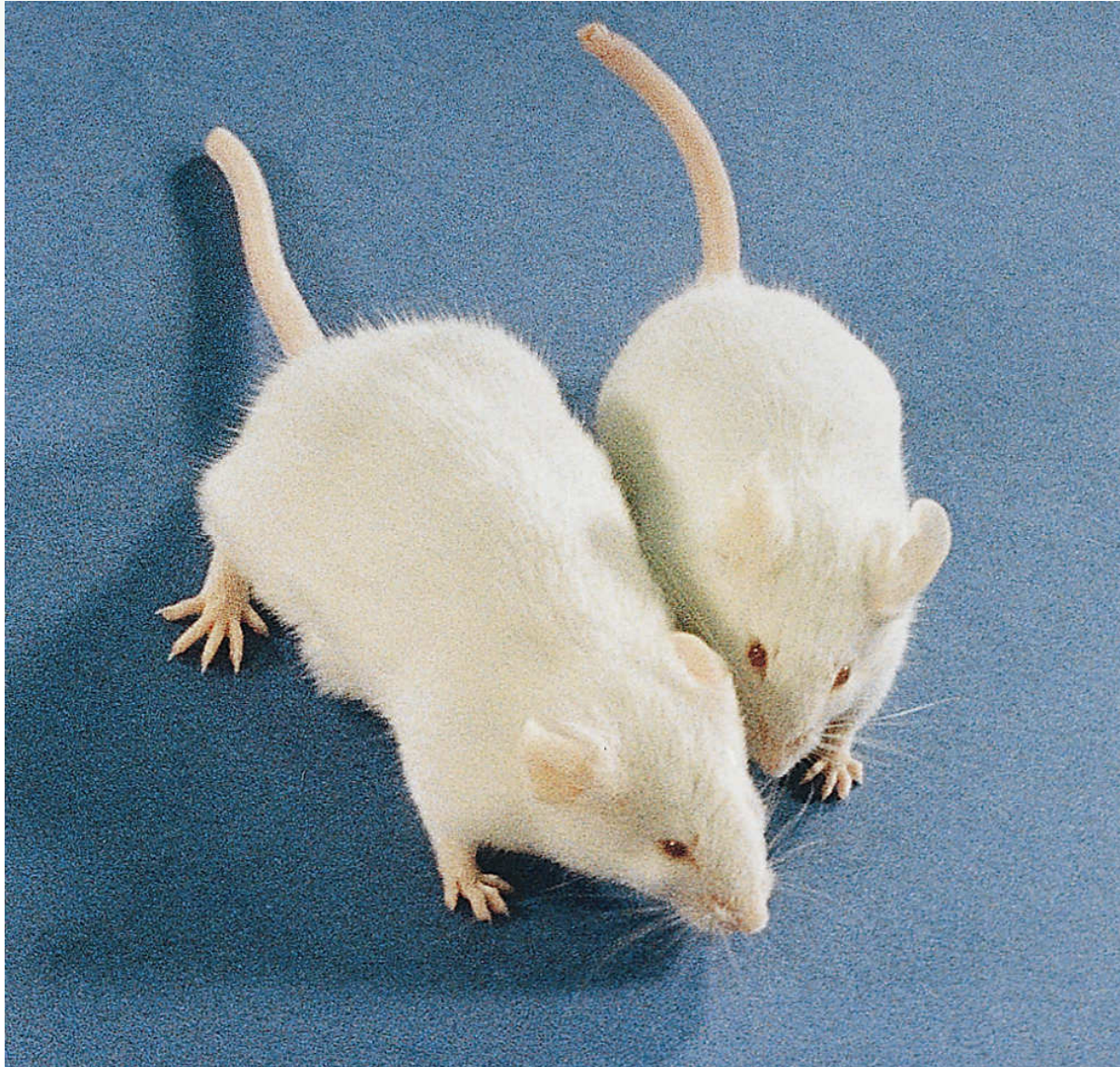
Manipulace s embryonálními kmenovými buňkami



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 redukuje toxicitu některých rostlin (rozšíření potenciálu krmiv)
- Drůbež s pozmeněnými trávicími schopnostmi (celulóza, lignin, tuky)
- Drůbež se zvýšeným obsahem lysozymu ve vejcích (využití v průmyslu a farmakologii)
- Ovce s vylepšenou srstí
- **Myši s pozmeněnými 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 pozmeněnými antigeními vlastnostmi vhodné pro člověka
- **Zvířata produkující cizorodé látky v mléce, moči, krvi nebo tkáních (animal farming: zvířata jako bioreaktory)**

Myš nesoucí gen pro lidský růstový hormon



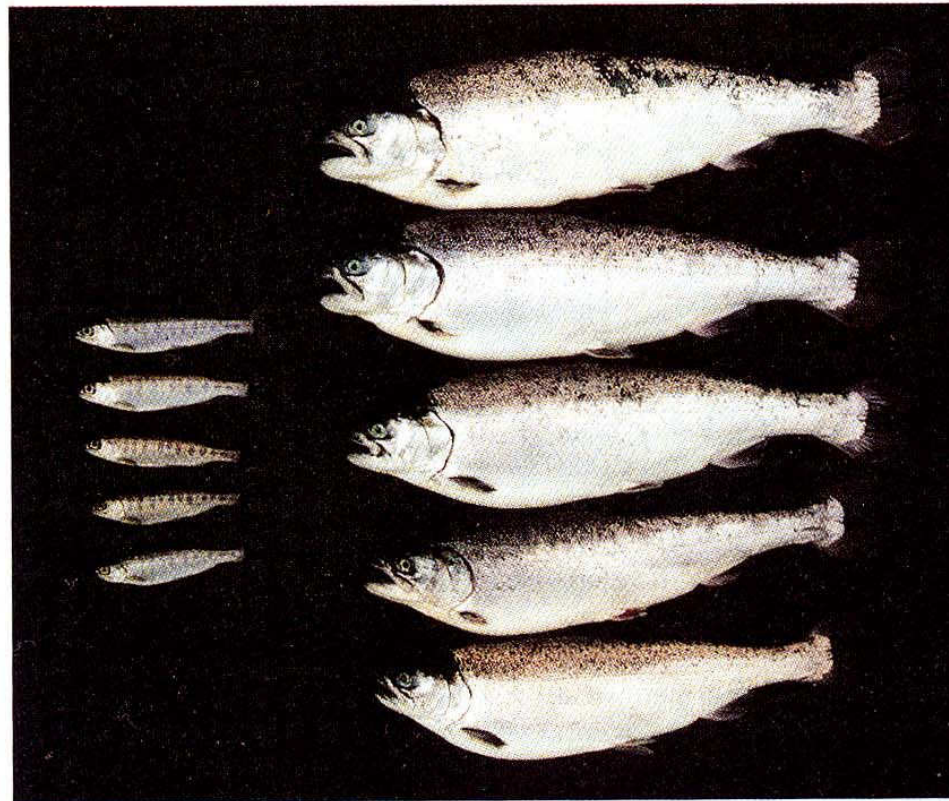


Figure 11.18 Normal coho salmon (left) and genetically engineered coho salmon (right) containing a sockeye salmon growth-hormone gene driven by the regulatory region from a metallothionein gene. The transgenic salmon average 11 times the weight of the nontransgenic fish. The smallest

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.]

Zvířata jako bioreaktory: „animal farming“



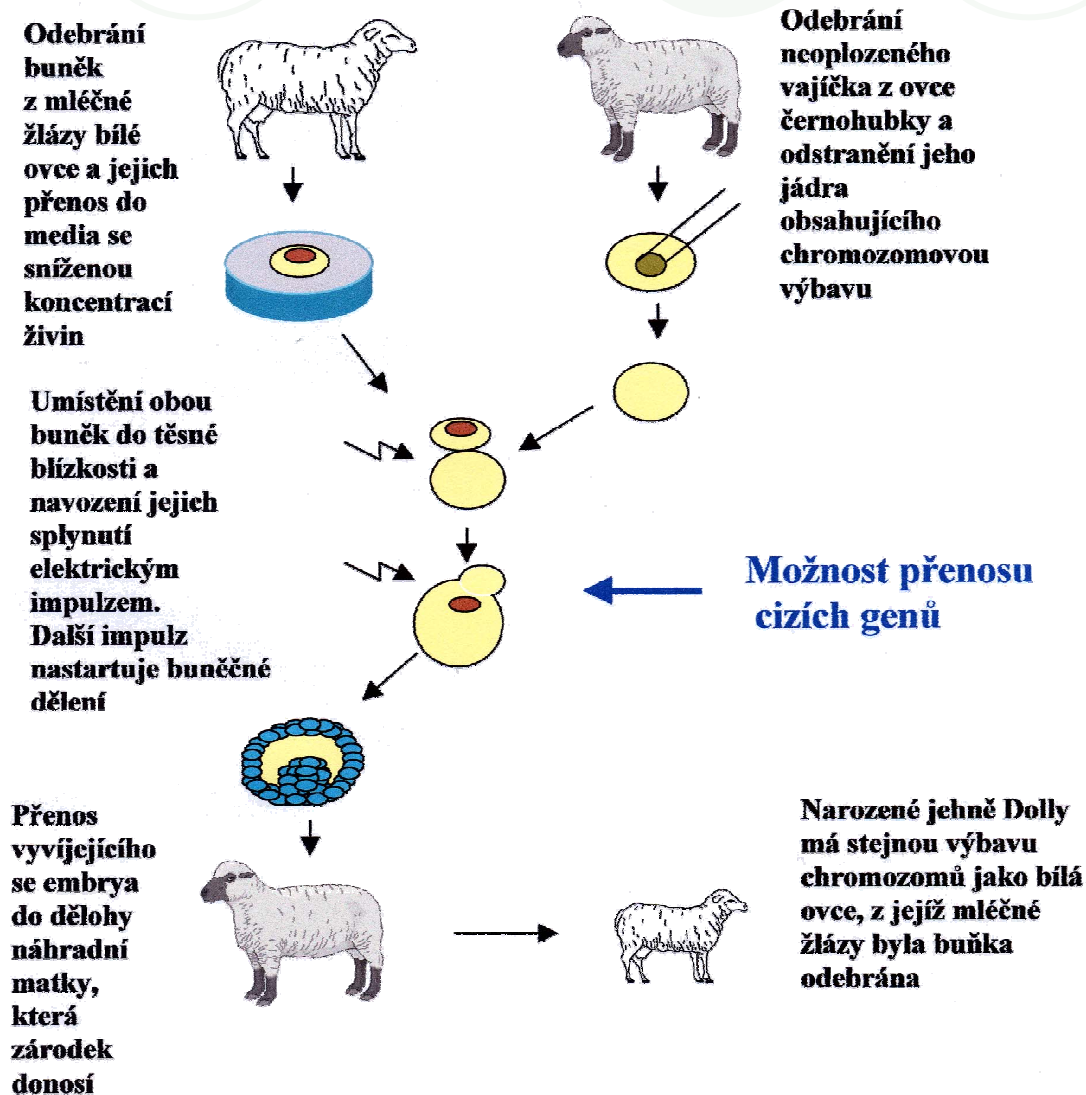
Příklady látek vytvářených v transgenních zvířatech

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

koza – protein pavoučího vlákna v mléce, atp.

kráva – lysozym **nebo lysostafin** v mléce

Klonování savců doplněné o genetickou modifikaci



Možné způsoby léčby genetických onemocnění

1. **Úprava diety - kareční terapie** (galaktosemie, fenylketonurie)
2. **Substituční terapie** (hemofilie, diabetes, nanismus)
3. **Genová terapie** (kauzální léčba)
 - vnesení funkčního genu (funkční alely) do genomu
 - cílená záměna poškozeného genu homologní rekombinací
 - cílené usmrcování geneticky pozměněných buněk
 - cílená inhibice exprese genů zodpovědných za genetickou poruchu

Genové terapie

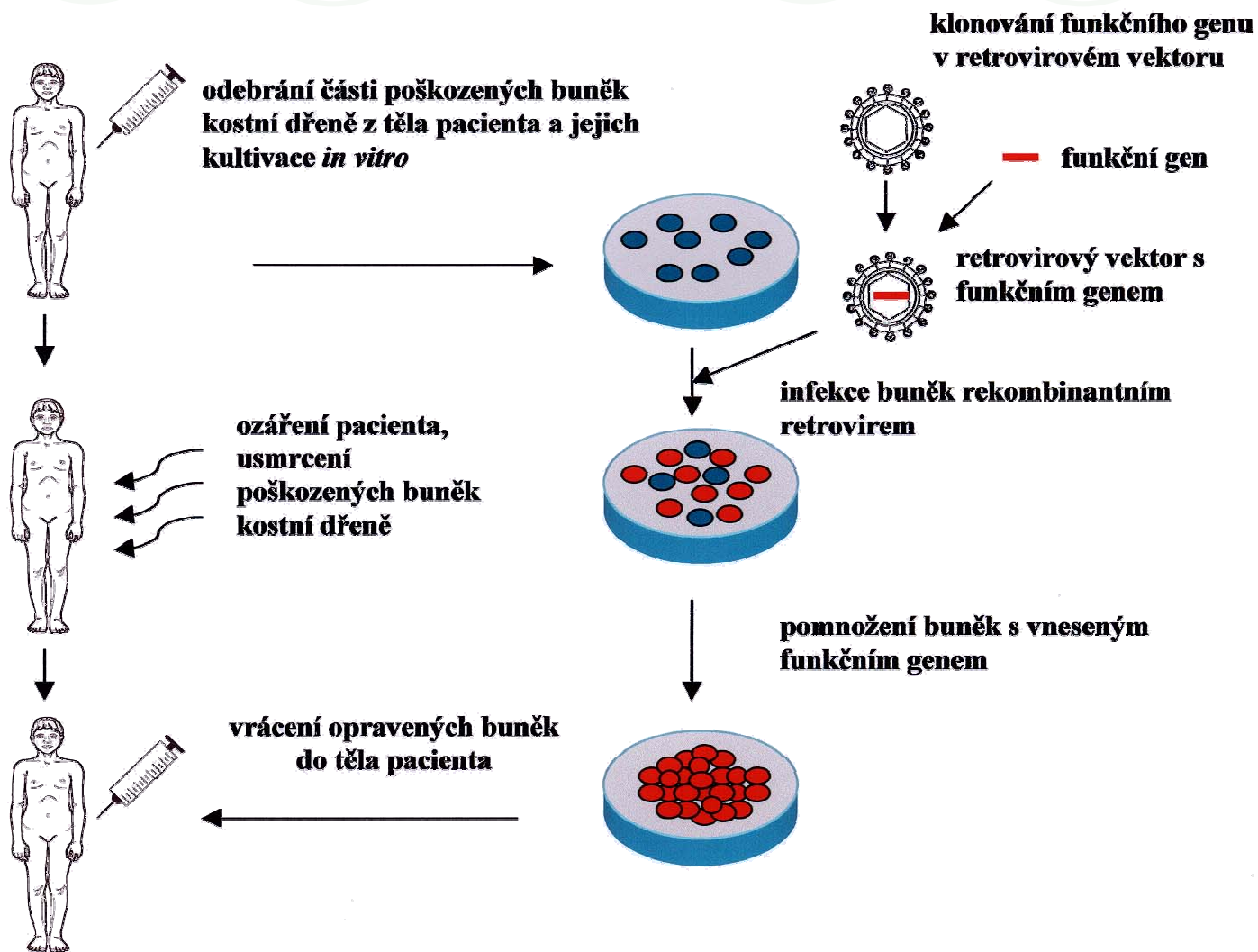


- Léčba genetických chorob
 - dědičných
 - nádorových
- **Podle typu buněk, do nichž jsou geny vneseny:**
 - A. genová terapie zárodečných buněk
 - B. genová terapie somatických buněk
- **Podle způsobu přenosu genů:**
 - A. genová terapie in vitro (ex vivo)
 - B. genová terapie in vivo

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 ⁶
Fenylketonurie	Fyzická a psychická retardace.	fenylalaninhydroxyláza	1/12 000
Hemofilie A + B	Porucha v srážlivosti krve, krvácivost.	faktor VIII, faktor IX	1/10 ⁶ mužů
Familiární hypercholesterolemie	Předčasné arteriosklerotické změny cév.	LDL-receptor	1/500
Deficience na α_1 -antitrypsin	Plicní emfyzém, (rozedma plic).	α_1 -antitrypsin	1/3 500
Cystická fibróza, CF	Porucha v transportu Na ⁻ , zahlenění dýchacích cest, embolie.	transmembrá-nový 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 ⁶

Genová terapie in vitro



Vlastnosti buněk vhodných jako vektory pro zavádění genů do organismu

1. Snadné získání buněk z těla
 2. Snadná kultivace v kulturách in vitro
 3. Odolnost k manipulacím spojeným se zaváděním genů
 4. Schopnost navrácení buněk do organismu, kde se musí pomnožovat přetrvávat po dostatečně dlouhou dobu
- Kmenové buňky kostní dřeně
 - Kožní fibroblasty
 - Hepatocyty
 - Myelocyty

Schéma postupu při genové terapii deficience na adenozeindeaminázu

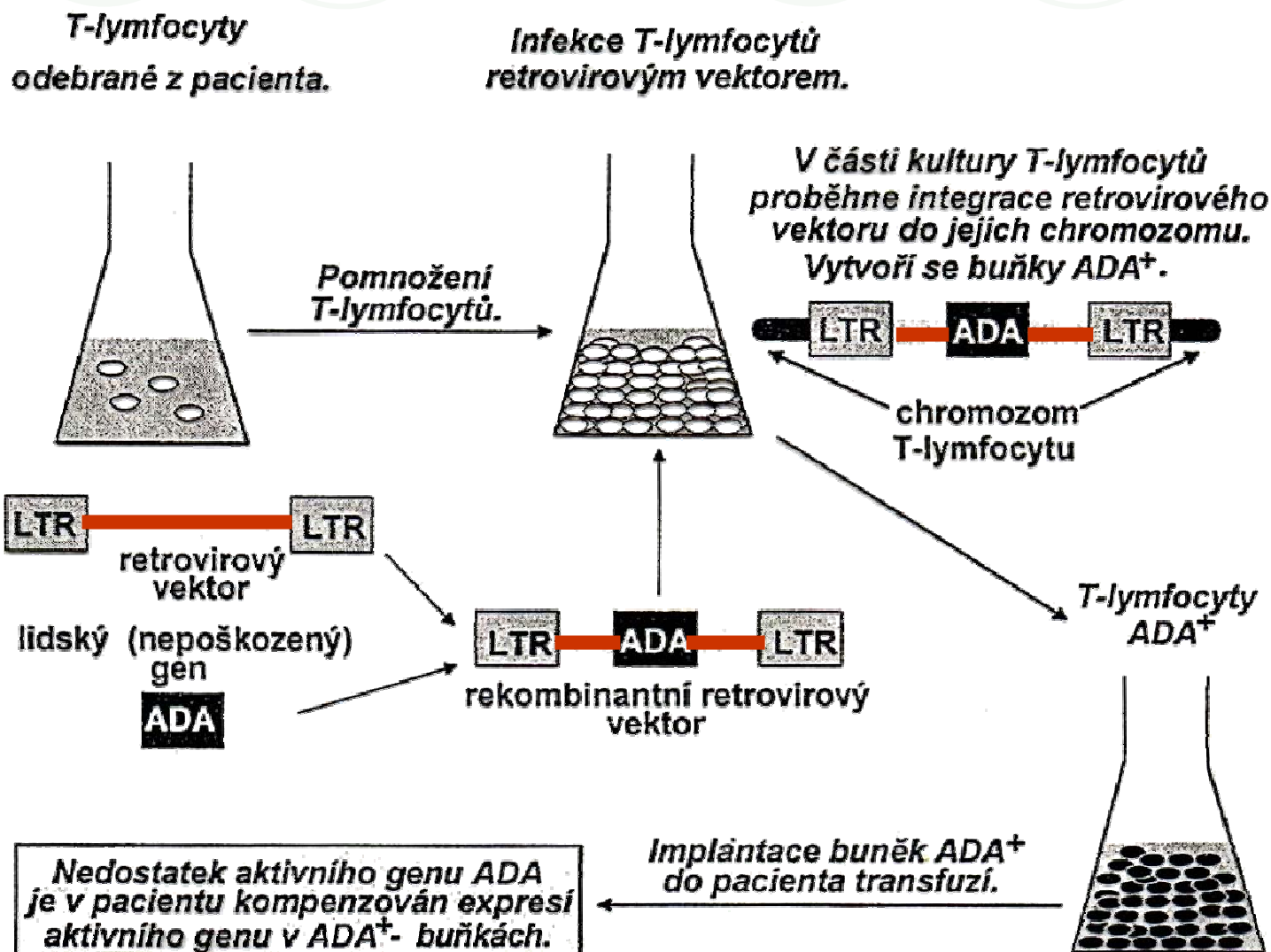
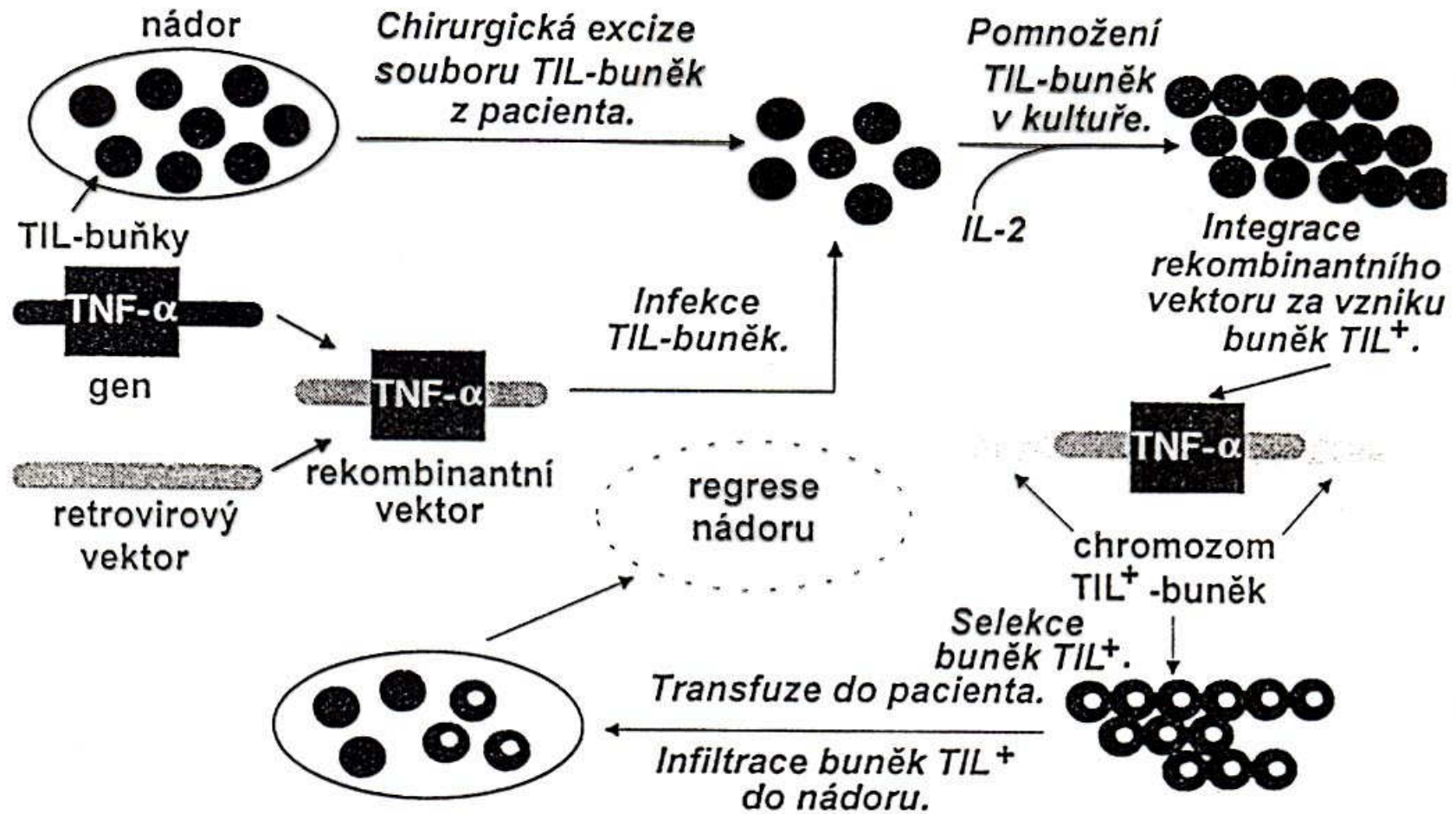


Schéma genové terapie melanomu



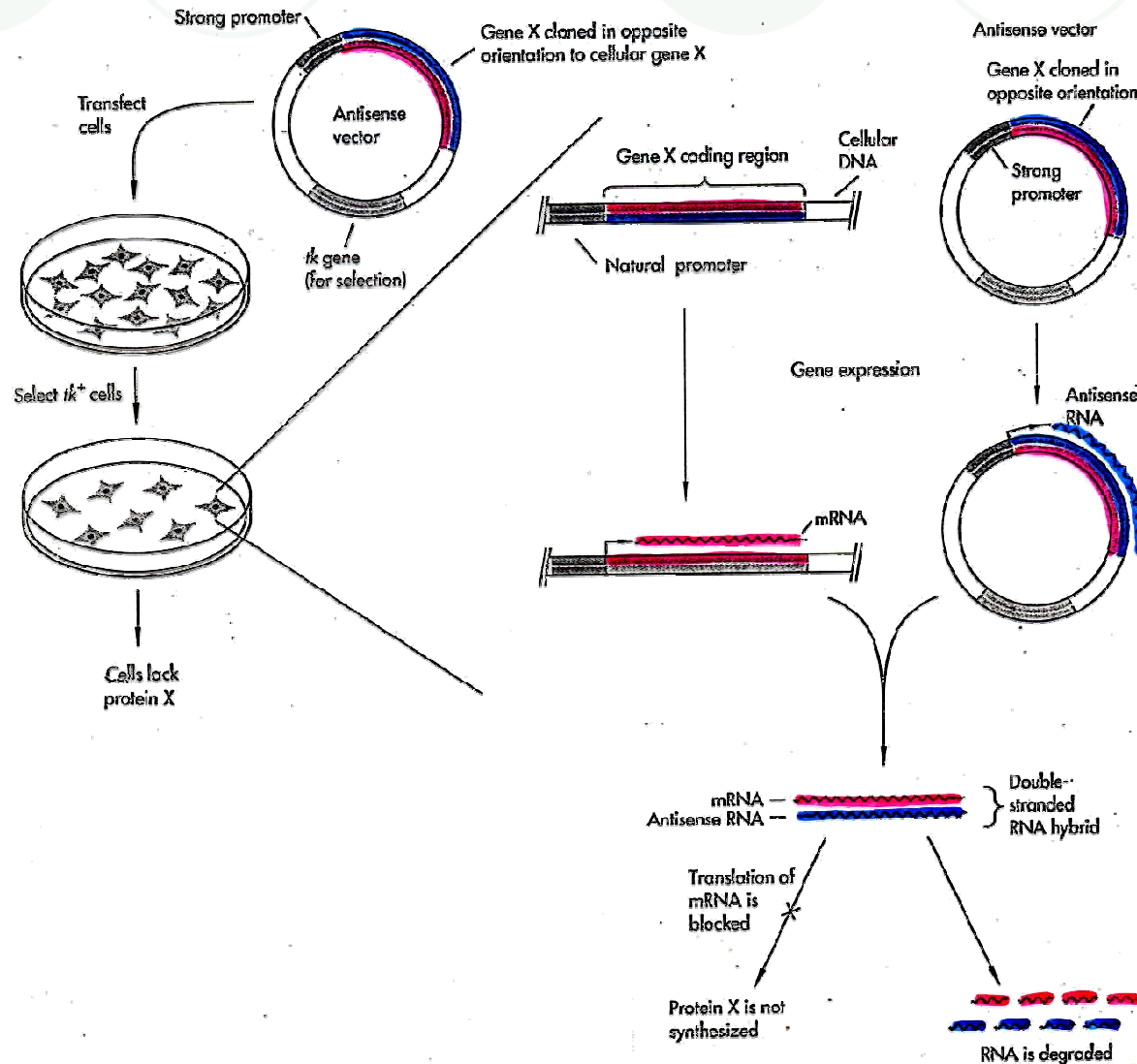
TIL = tumor infiltrující lymfocyty; TNF α = tumor nekrotizující faktor

Viry jako vektory

nejpoužívanější v GT, velmi dobře infikují lidské buňky. Asi 70% pokusů s GT

- **Onkoretroviry:** transgen začleňují do chromozomu do dělících se buněk - výhoda při léčbě nádorů (např. nádory mozku). Riziko inzerční inaktivace endogenů
- **Adenoviry:** infikují nedělící se buňky, DNA zůstává jako epizom v jádře. Jsou bezpečné, ale exprese je krátkodobá. Problém je imunogenicita. Uplatnění tam, kde je nutná vysoká exprese během krátké doby, např. při léčbě rakoviny pro zabití buněk.
- **Adenoasociované viry AAVs:** Nepatogenní, schopné infekce jen s využitím adenovirů jako pomocných virů k replikaci. Integrují DNA do chromozomu na specifické místo, umožňující dlouhodobou expresi bez rizika inzerční mutageneze.
- **Lentiviry:** HIV (retrovirus) – infikují nedělící se buňky. Do chromozomu se integrují náhodně - dlouhodobá exprese. Nutnost odstranění virových genů a zachování schopnosti infikovat nedělící se buňky.
- **Herpes simplex viry:** Mají tropii pro CNS, v latentní infekci jsou epizomální, tj. dlouhodobě exprimují transgen a šíří jej do okolní synaptické sítě. Hlavní úloha: přenos genů do neuronů pro léčbu nervových chorob (Parkinsonova ch.) a tumory CNS.

Zábrana exprese genů navozená protismyslovou RNA



Příklady léčby nádorů pomocí genové terapie

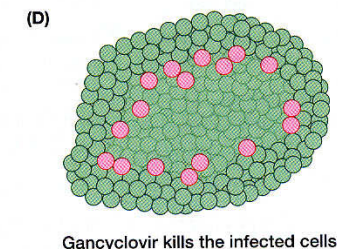
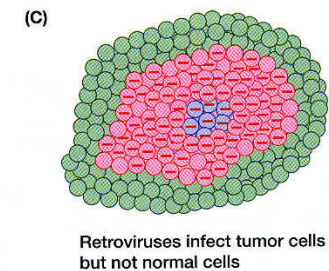
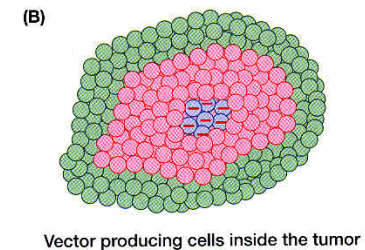
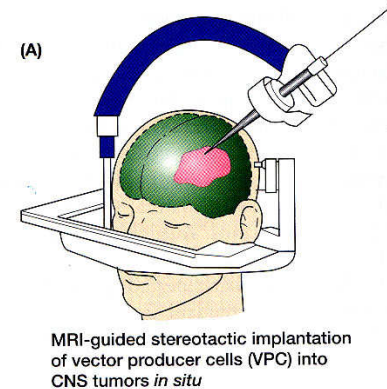
Typ nádoru	Změněné buňky	Použitá strategie genové terapie
Vaječník	Nádorové buňky	Intraperitoneální injekce retrovirů nebo adenovirů s genem p53 nebo BRCA1 – obnova kontroly buněčného cyklu
Vaječník	Nádorové buňky	Injekce adenoviru s scFv protilátkou proti onkoproteinu ErbB2. Snaha o inaktivaci růstového 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 usmrčovány

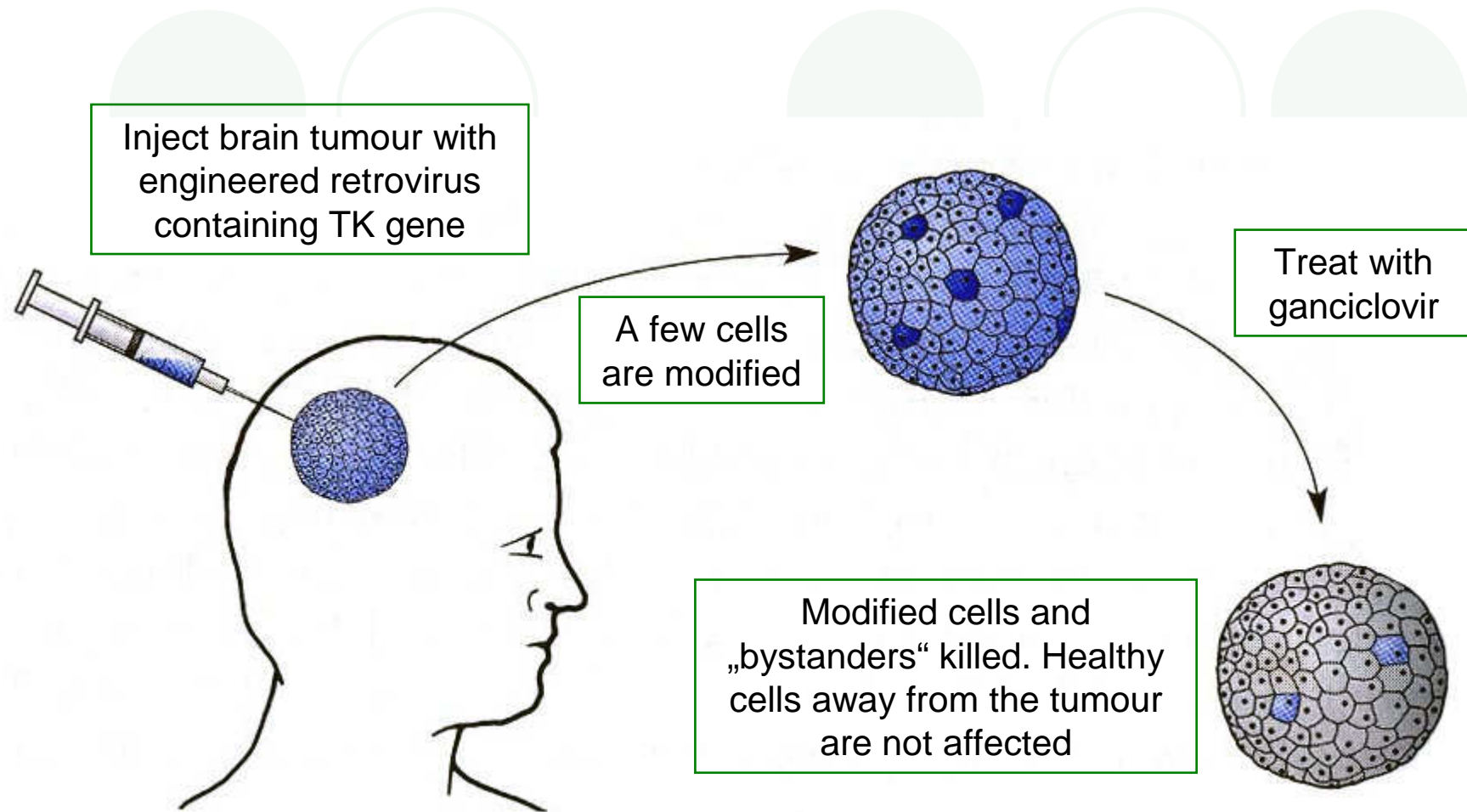
Genová terapie nádorů

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**

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 gancyklovir-trifosfát usmrcující nádorové buňky.





Gene therapy for brain tumours. The tumour is directly injected with a retrovirus containing the mouse thymidine kinase (TK) gene and a few cells take up the vector, shown in blue. These cells convert the prodrug ganciclovir into an active form and are killed (grey cells). Because of the bystander effect surrounding cells are also killed.

Příklad úspěšné léčby chorob genovou terapií

X-SCID – těžká kombinovaná imunodeficience vázaná na X

chromozom: mutace genu kódujícího γ 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)

