



Genové inženýrství

Genové inženýrství se zabývá vytvářením pozměněných či nových genů a jejich zaváděním do organizmů 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* (**editace genomů**).

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 bariér)**
 - 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 inzulinu 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

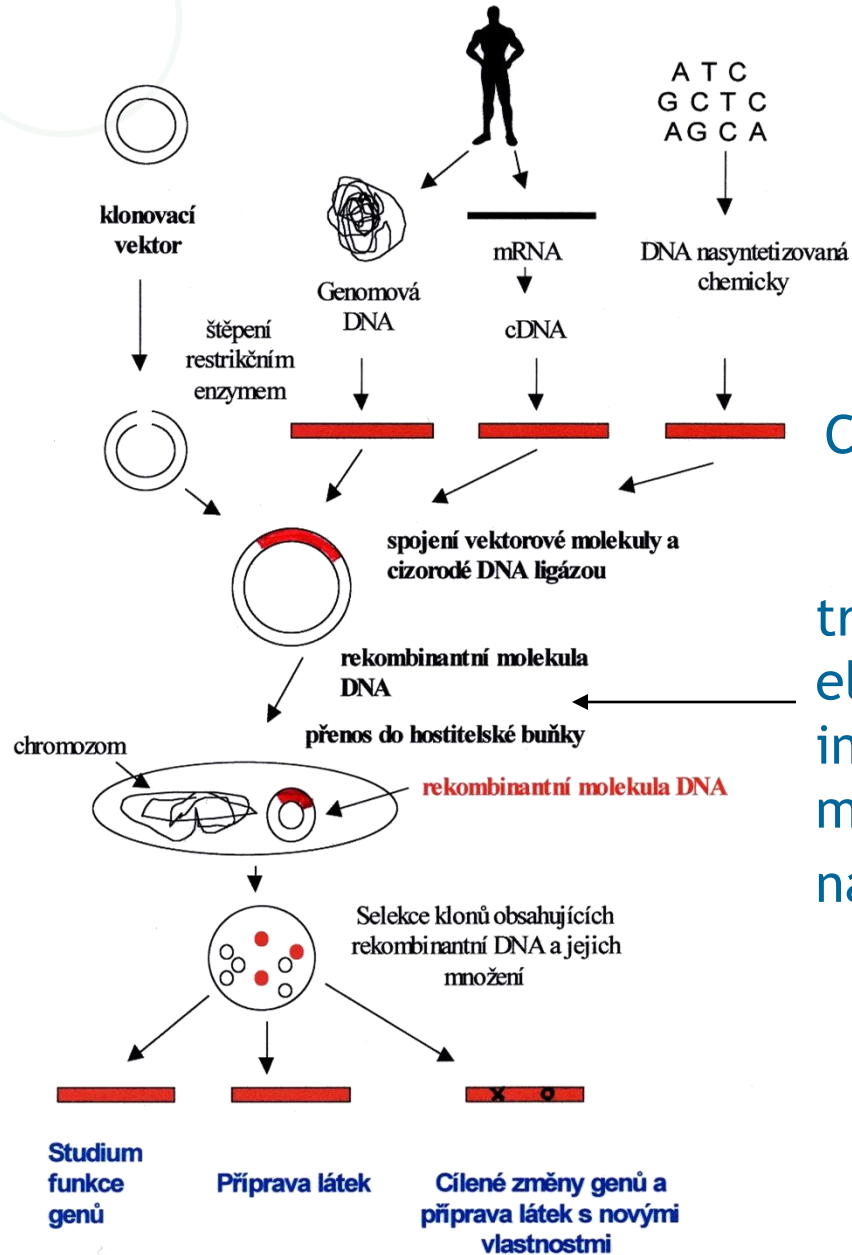
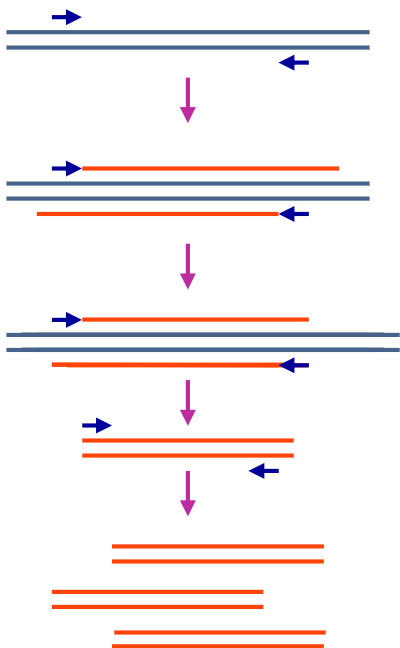
Po roce 2000: editace genomů - rekombinantní meganukleázy

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

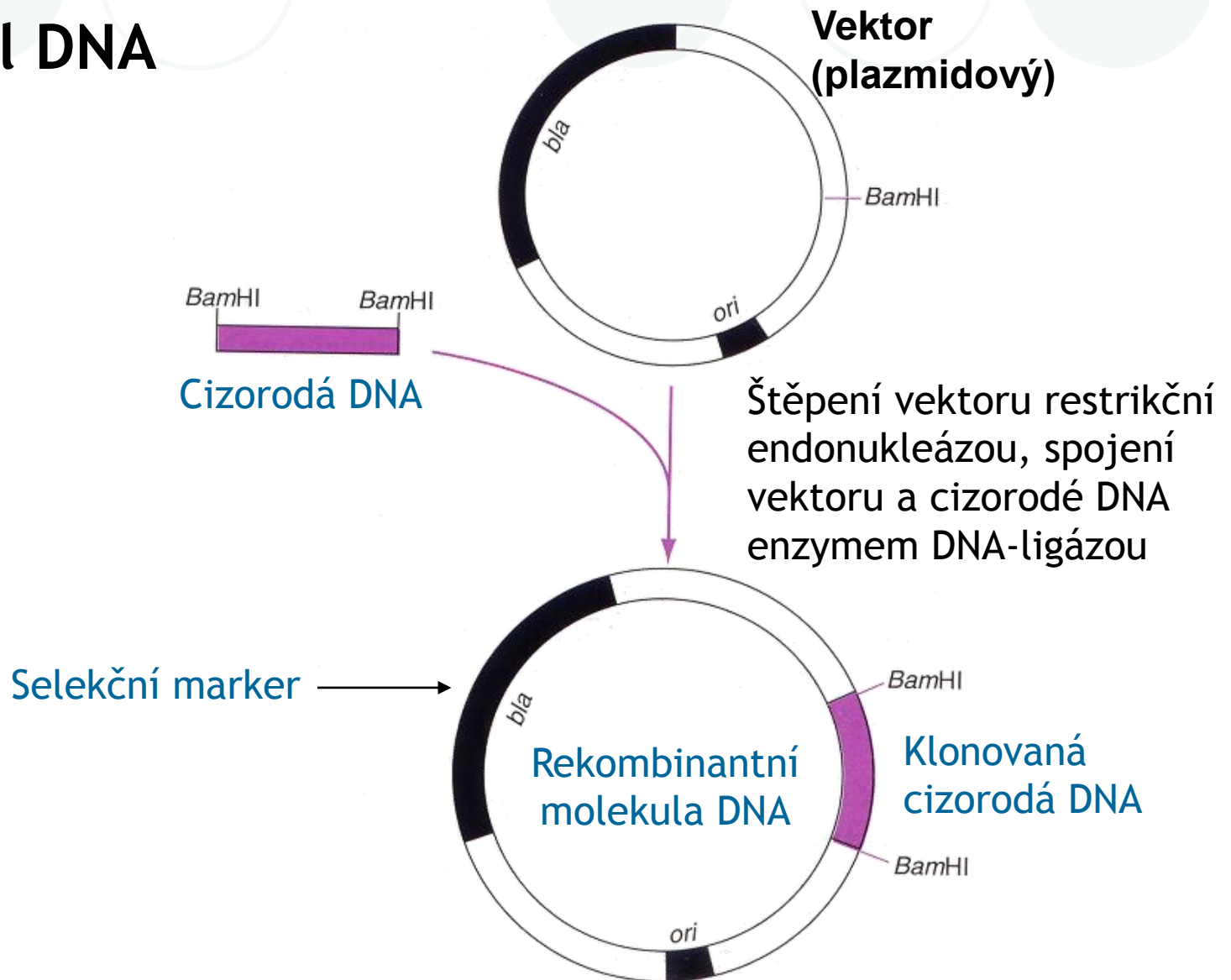
Klonování genů pomocí PCR



Cizorodá DNA

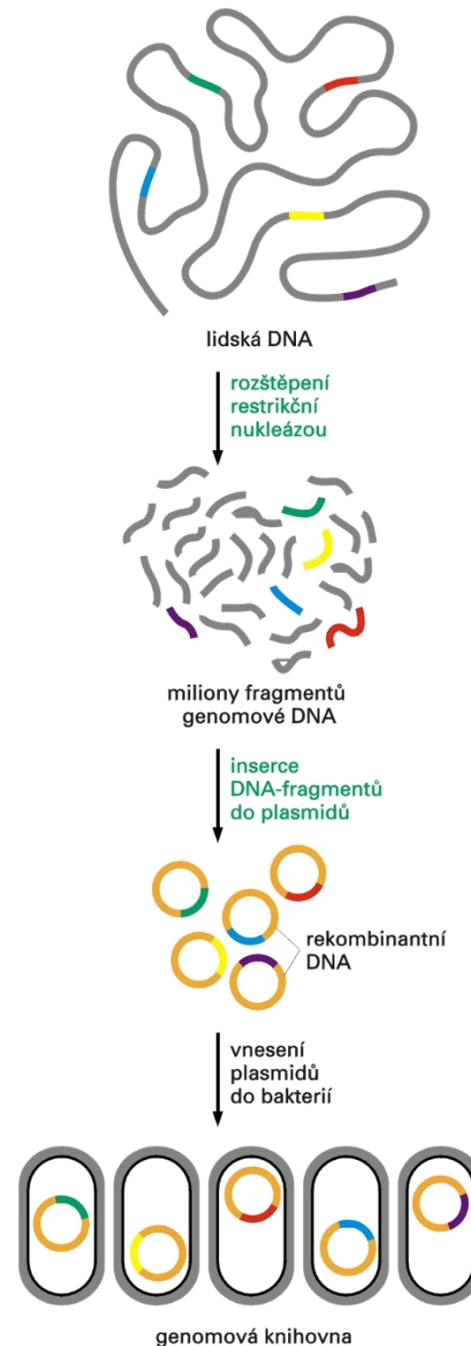
transformace
elektroporace
infekce
mikroinjekce
nastřelení

Příprava rekombinantních molekul DNA



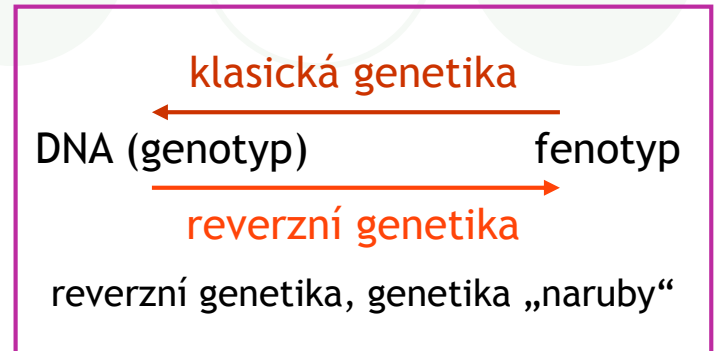
Konstrukce (lidské) genomové knihovny

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



Mutagenese *in vitro*

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



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

Mutageneze *in vitro*

Mutageneze *in vitro*

náhodná

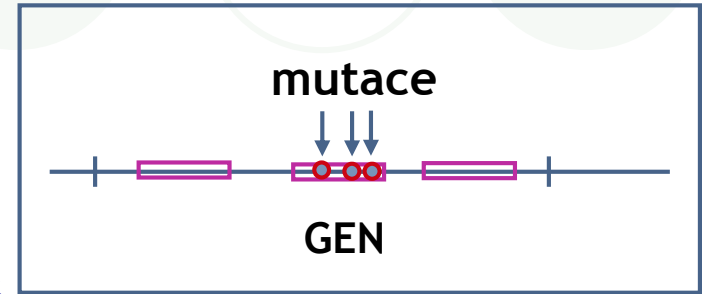
manipulace s restričními místy
inzerce linkerů
chemická mutagenese
inkorporace chybných bází

vyhledání genu nebo
funkčních oblastí na DNA

cílená

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

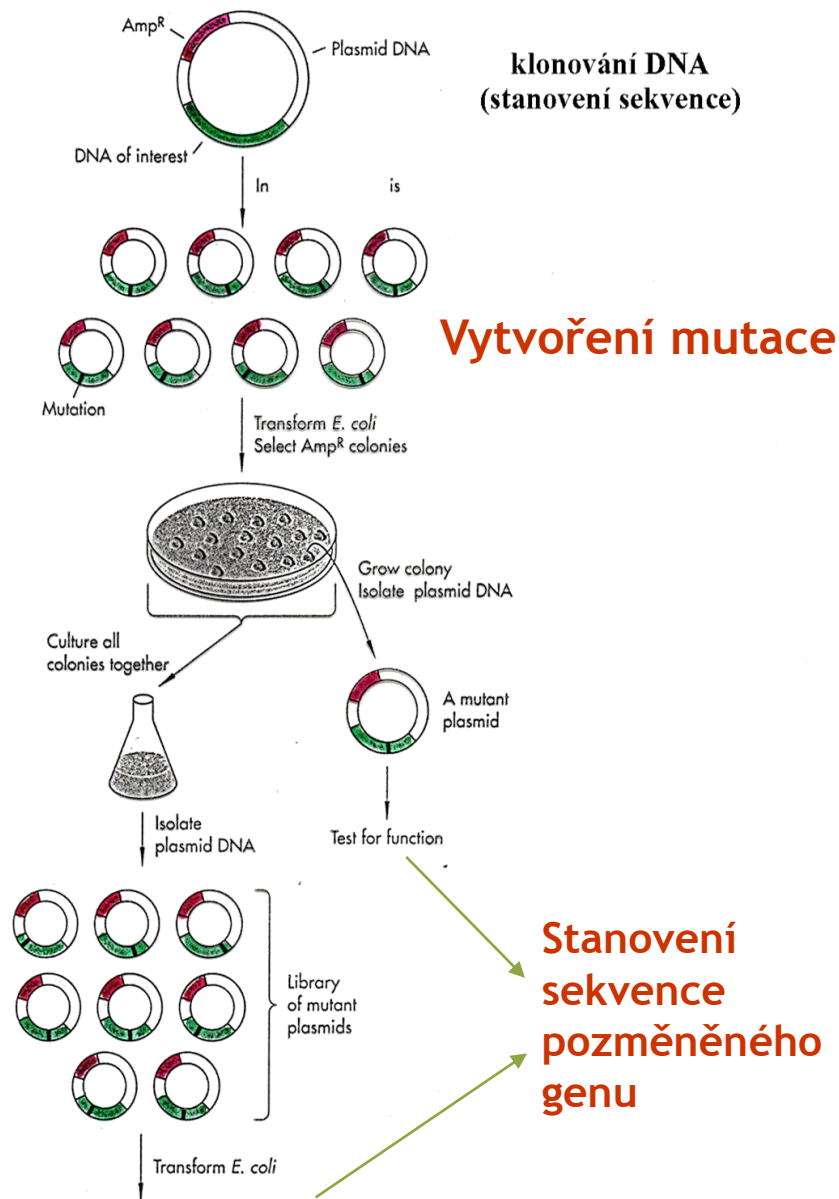
záměny bází nebo kodonů
cílené změny struktury
proteinů



Způsoby používané při mutagenезi in vitro

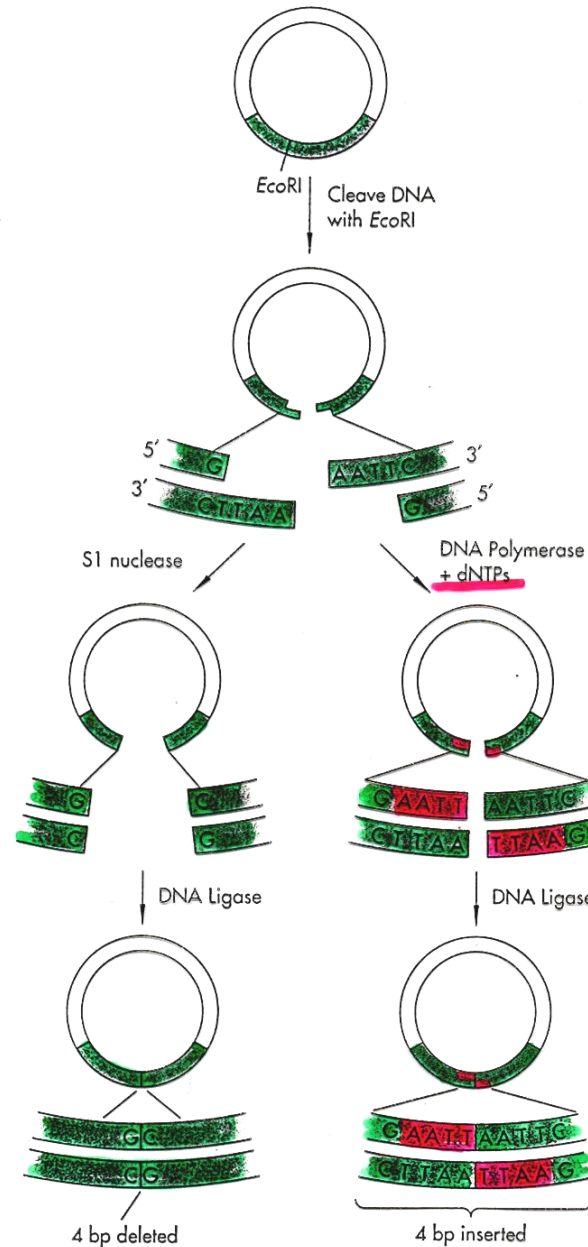
1. Manipulace s restrikčními místy a enzymatické úpravy DNA
2. Oligonukleotidová mutagenезe (extenze primeru)
3. Chemická mutagenезe
4. Kazetová mutagenезe
5. Metody založené na PCR
6. Mutagenезe pomocí supresorových tRNA

Obecná strategie při mutagenезi *in vitro*



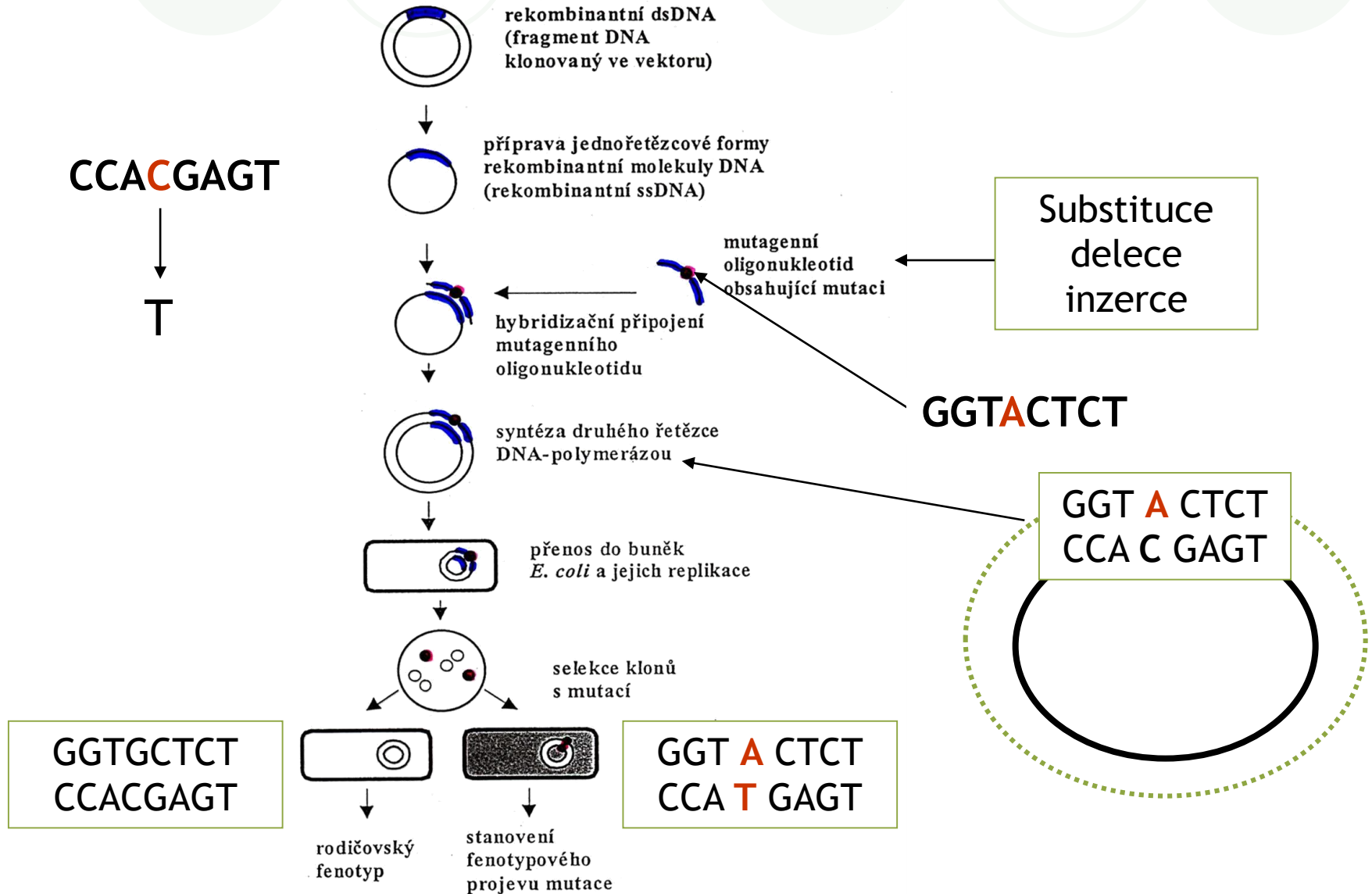
Testování funkce pozměněného genu

Vytváření mutací v restričním místě



Vytváření inzercí nebo
deleci v sekvenci genu

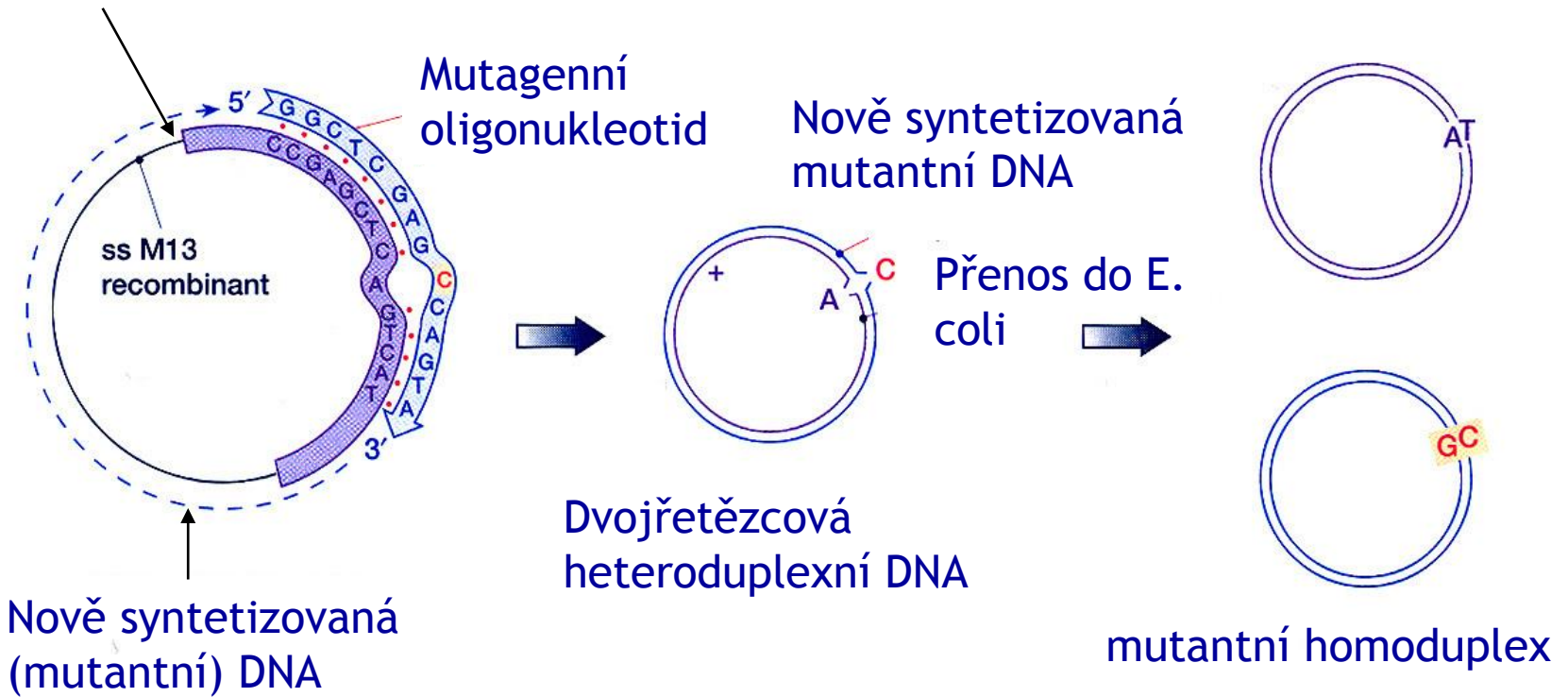
Mutageneze pomocí mutantních oligonukleotidů



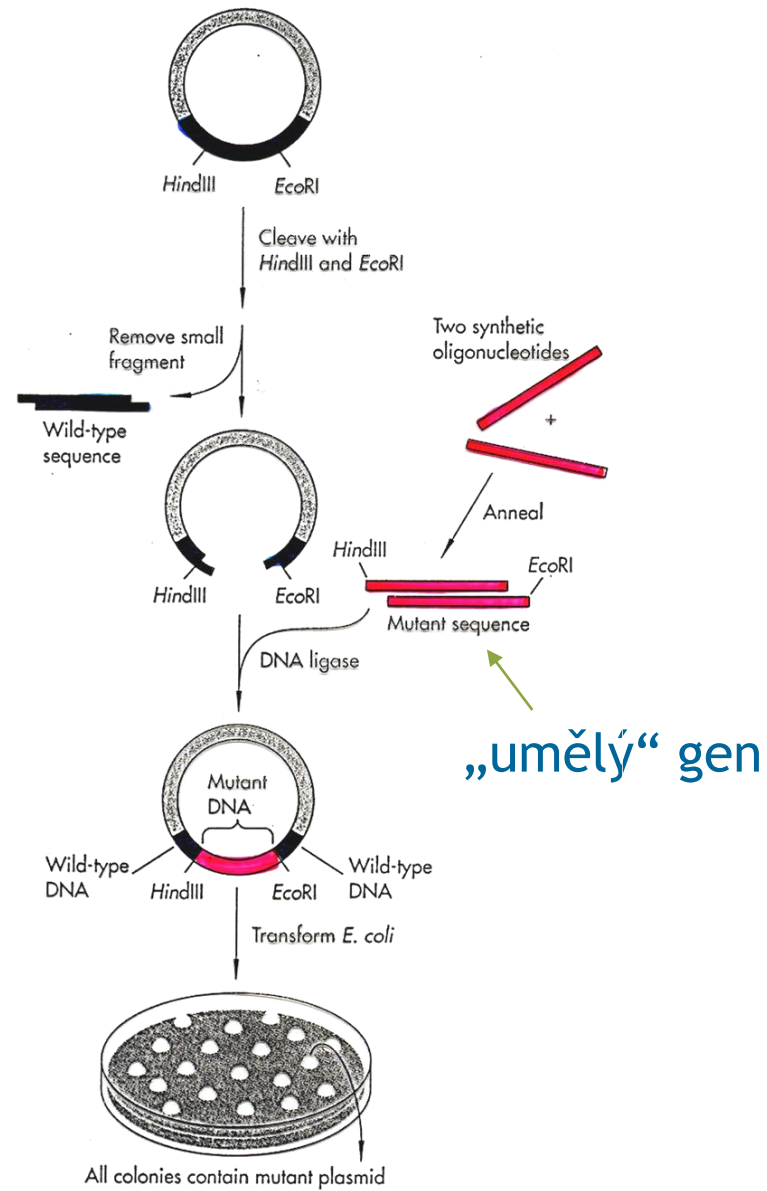
Mutagenese pomocí mutagenních oligonukleotidů

Rodičovská
(nemutantní) DNA

rodičovský homoduplex



Kazetová mutace



Editace genomů

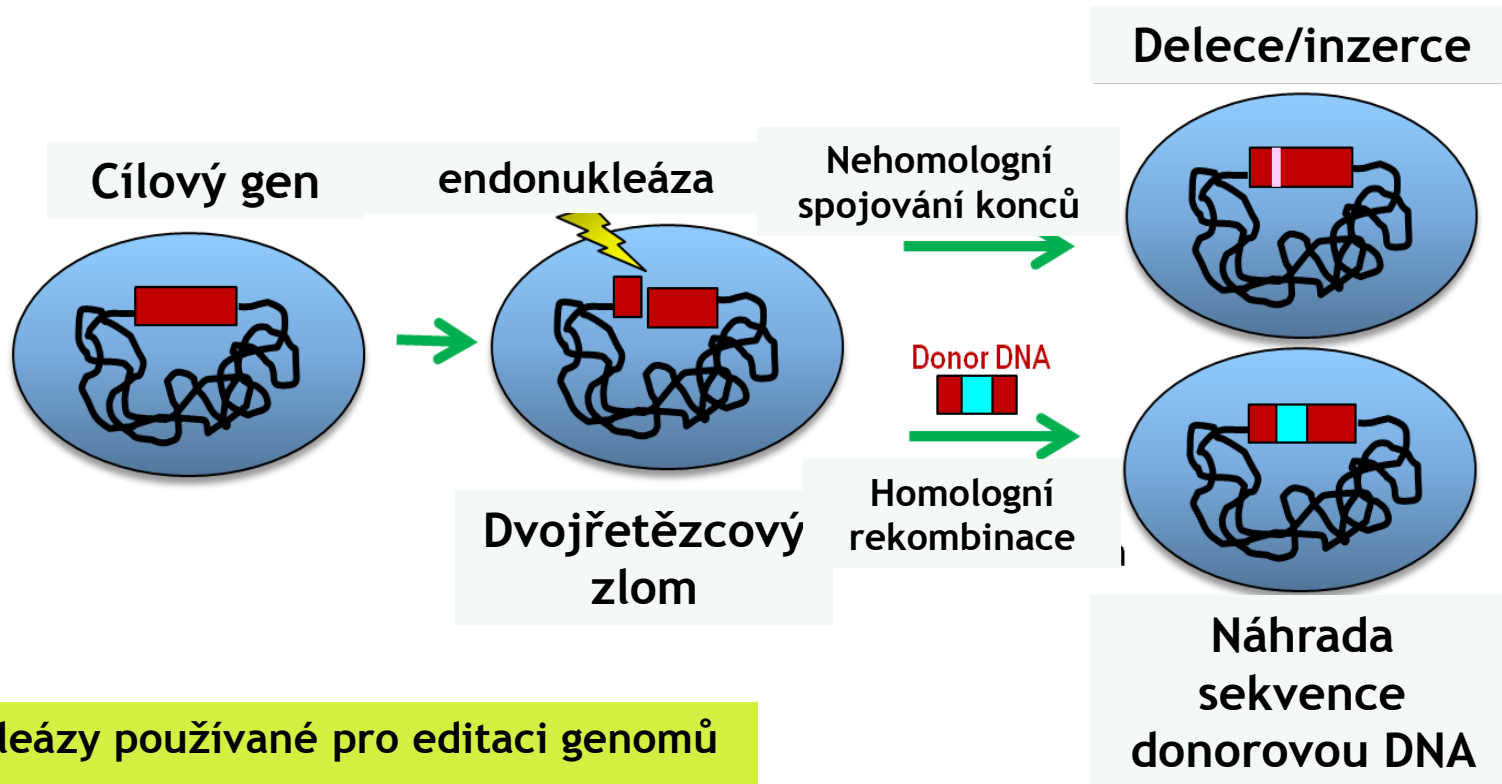
Genome editing, or genome editing with engineered nucleases (GEEN)

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)

Editace genomů (chromosome engineering)

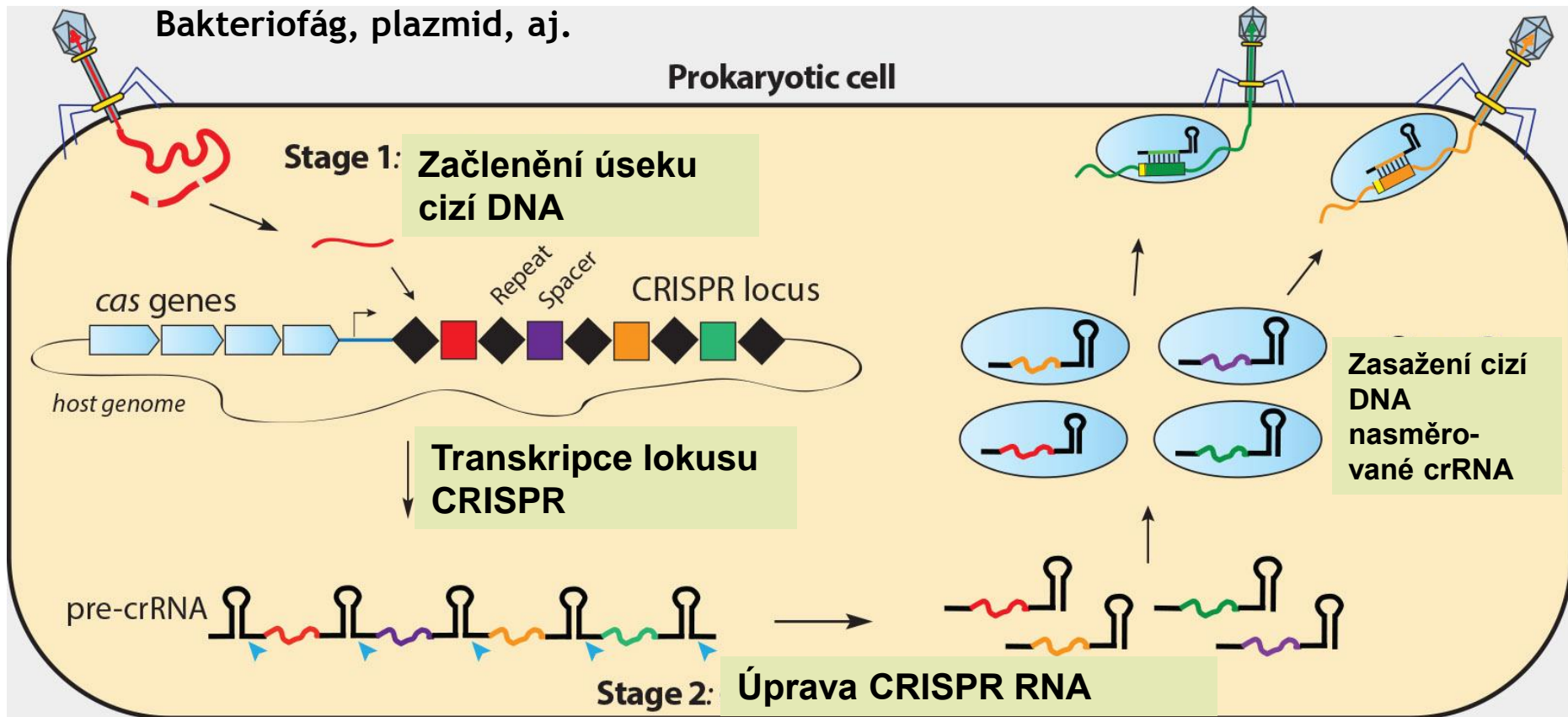


Nukleázy používané pro editaci genomů

- Meganukleázy
- ZNF
- TALEN
- CRISPR/Cas

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Cas – CRISPR-associated system (Cas9 – endonukleáza)



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 nepříbuzných 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

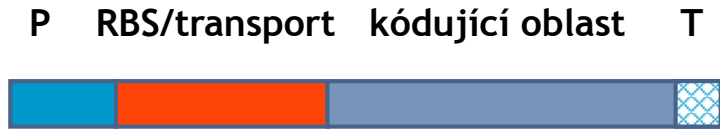
4. Transport proteinu

- signální sekvence funkční v daném hostiteli

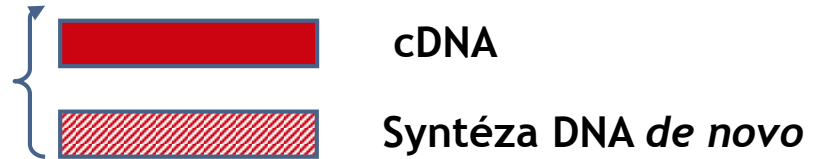
Zajištění exprese cizorodých genů

bakteriální gen

eukaryotický gen



Hybridní (chimerický) gen



Fúzní protein



štěpení, purifikace

zralý protein



prokaryotická část eukaryotická část

Gen pro inzulin DNA



Transkripce



pre-mRNA



Sestřih



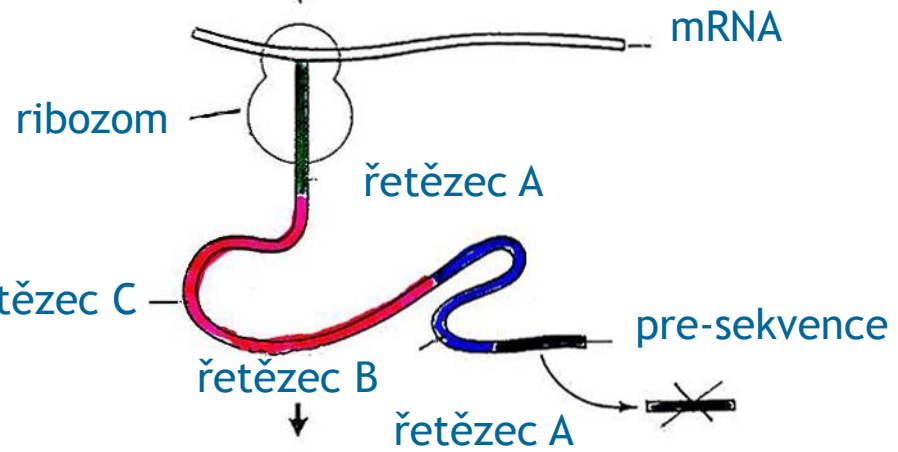
mRNA pro pre-proinzulin



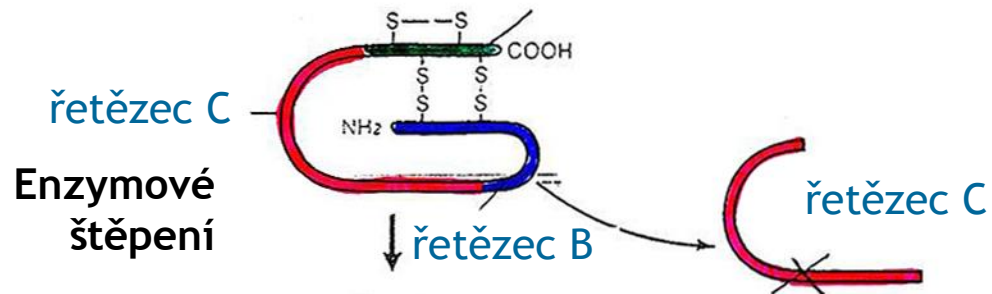
Translace



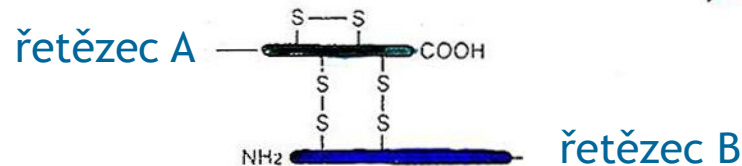
pre-proinzulin (preprohormon)



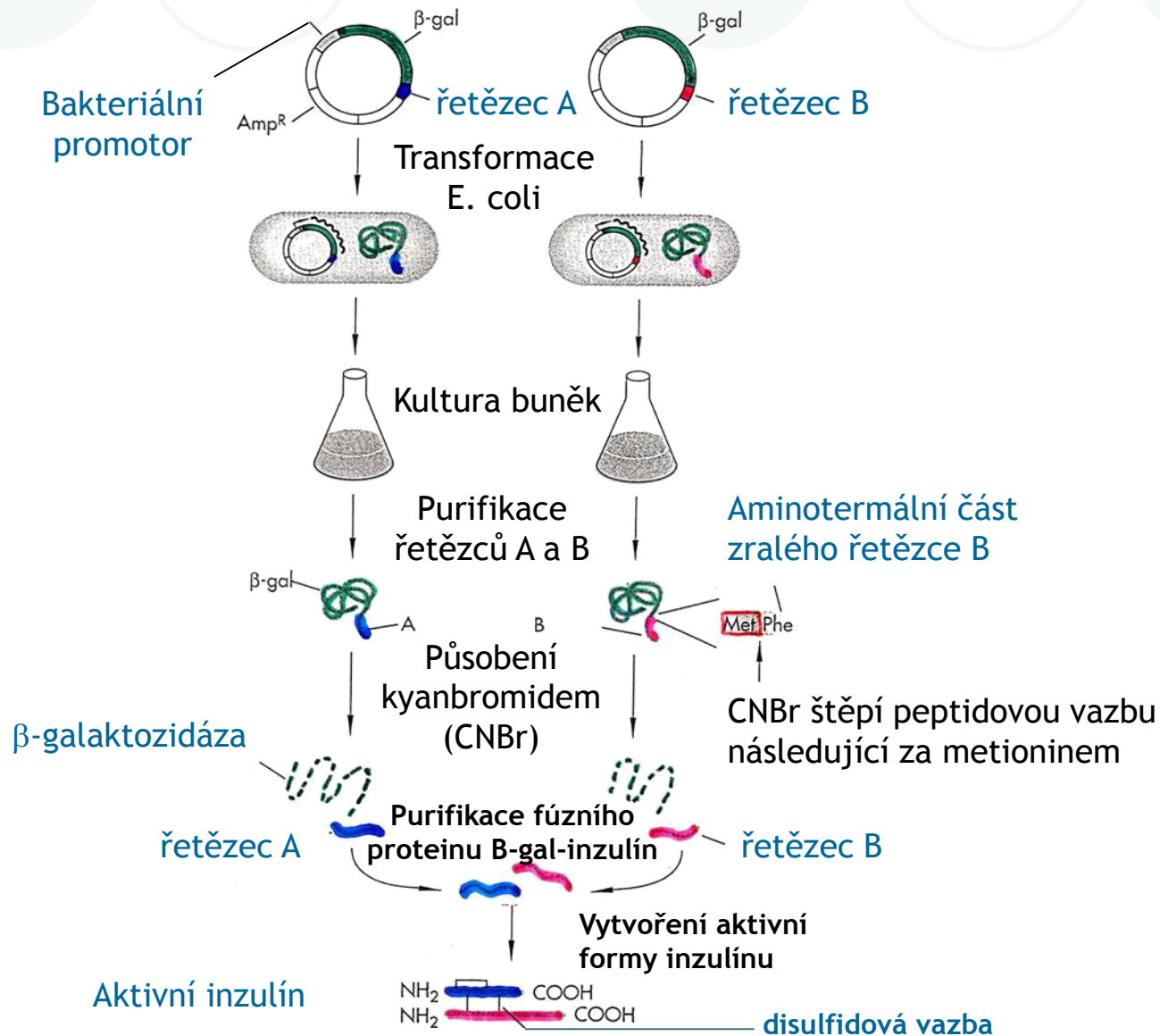
proinzulin (prohormon)



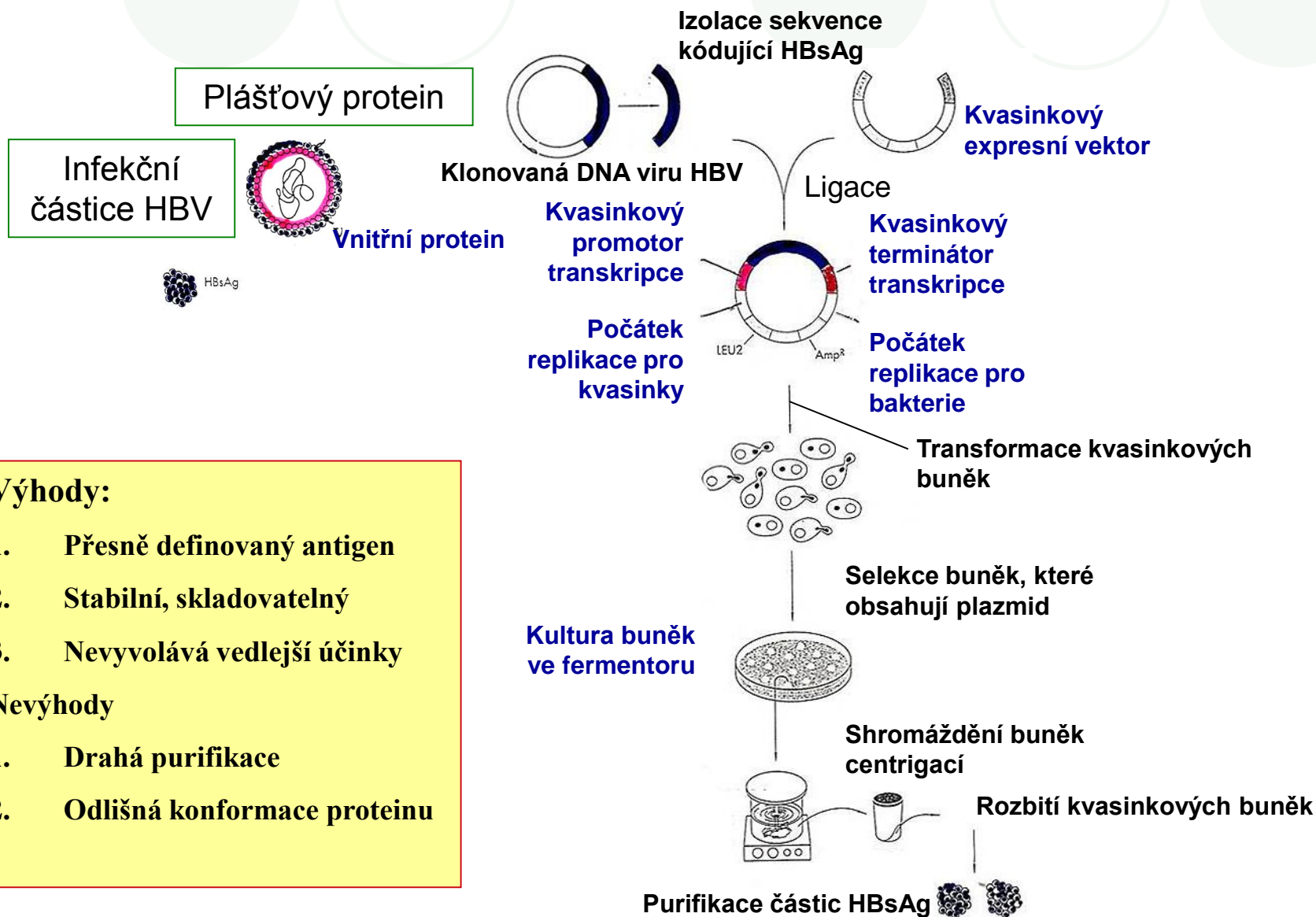
aktivní inzulin (zralý hormon)



Příprava lidského inzulinu v bakteriálních buňkách



Příprava podjednotkové vakcíny viru hepatitidy B (HBV) ve kvasinkách



Výhody:

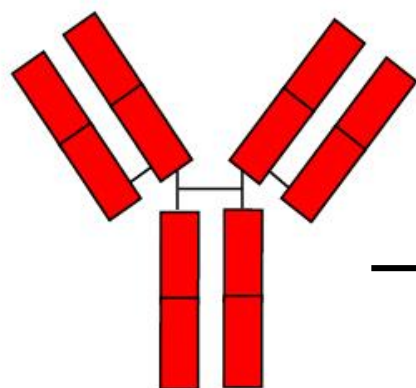
1. Přesně definovaný antigen
2. Stabilní, skladovatelný
3. Nevyvolává vedlejší účinky

Nevýhody

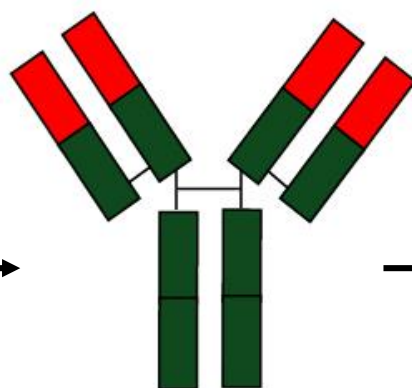
1. Drahá purifikace
2. Odlišná konformace proteinu

Příprava humanizovaných protilátek

Myší protilátka

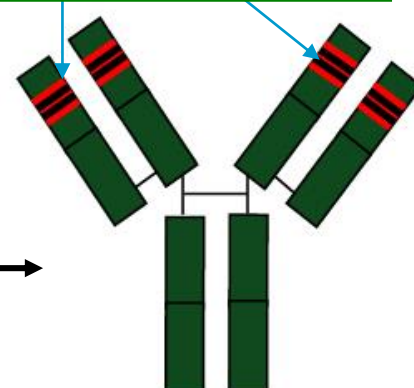


Chimerická protilátka



Humanizovaná protilátka

CDRs - complementarity determining regions



Variabilní, konstantní a hypervariabilní oblasti jsou z protilátek myši

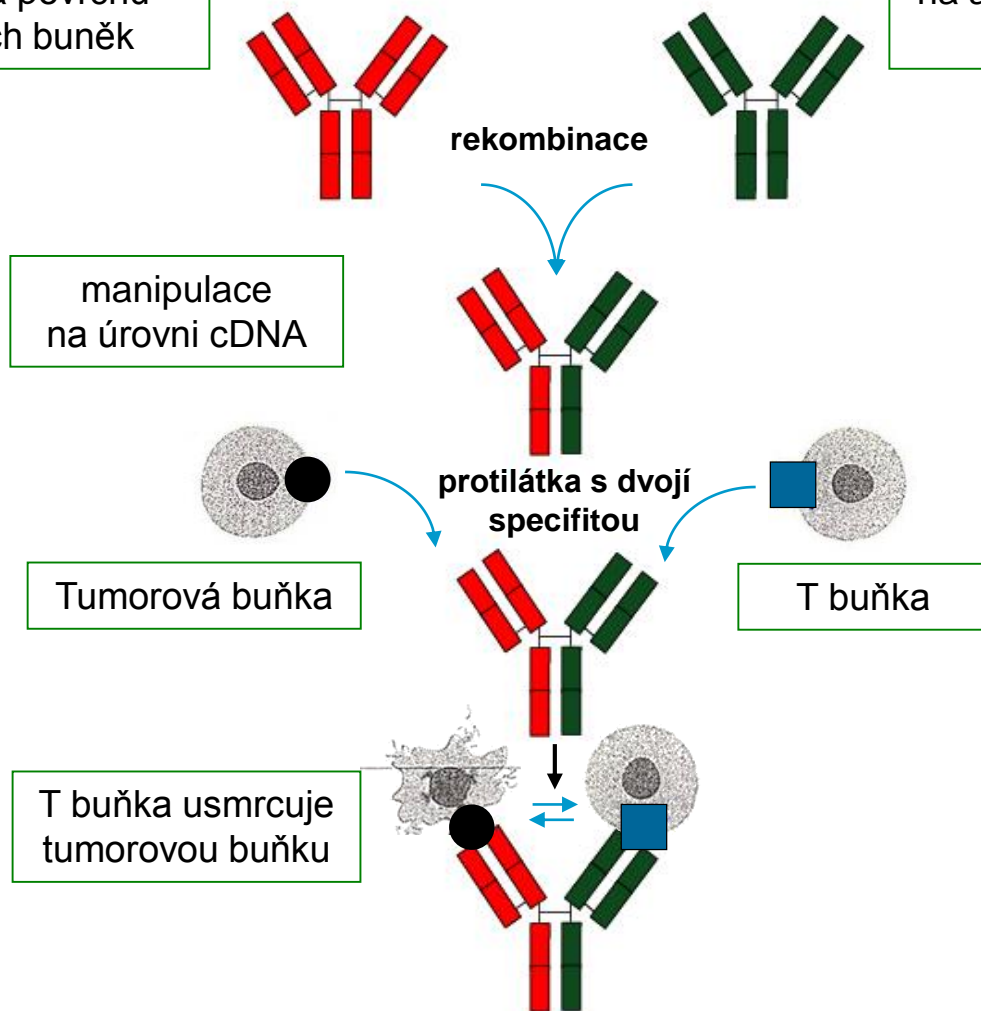
Konstantní oblast je z lidské protilátky, variabilní a hypervariabilní oblasti jsou z myši

Hypervariabilní oblasti jsou z myších protilátek, ostatní jsou lidské

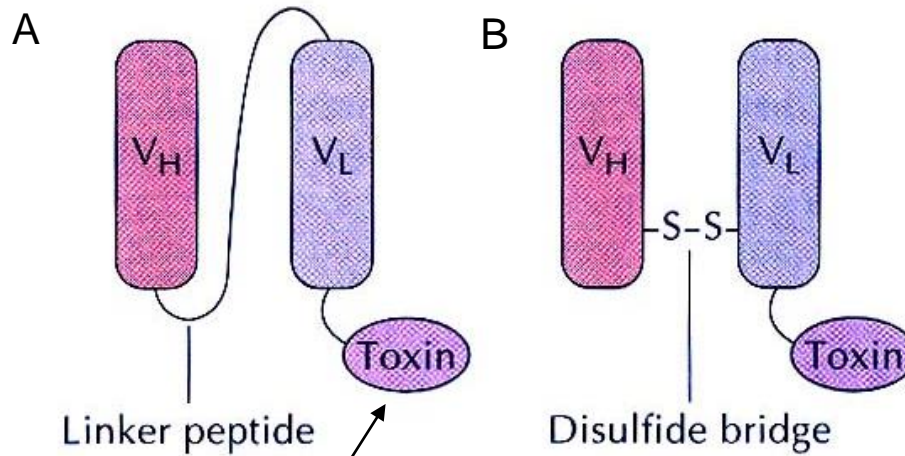
Protilátka s dvojí specifitou

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)

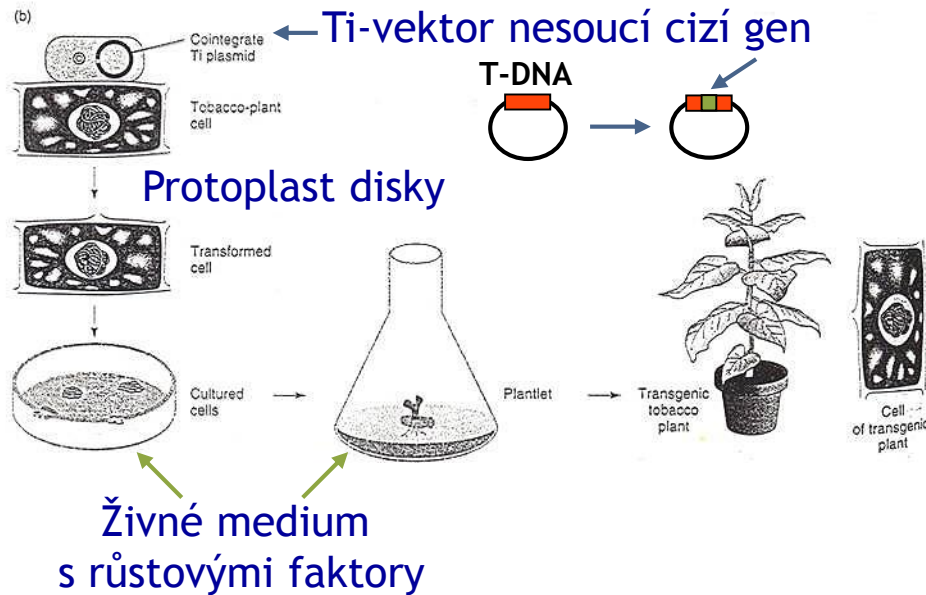
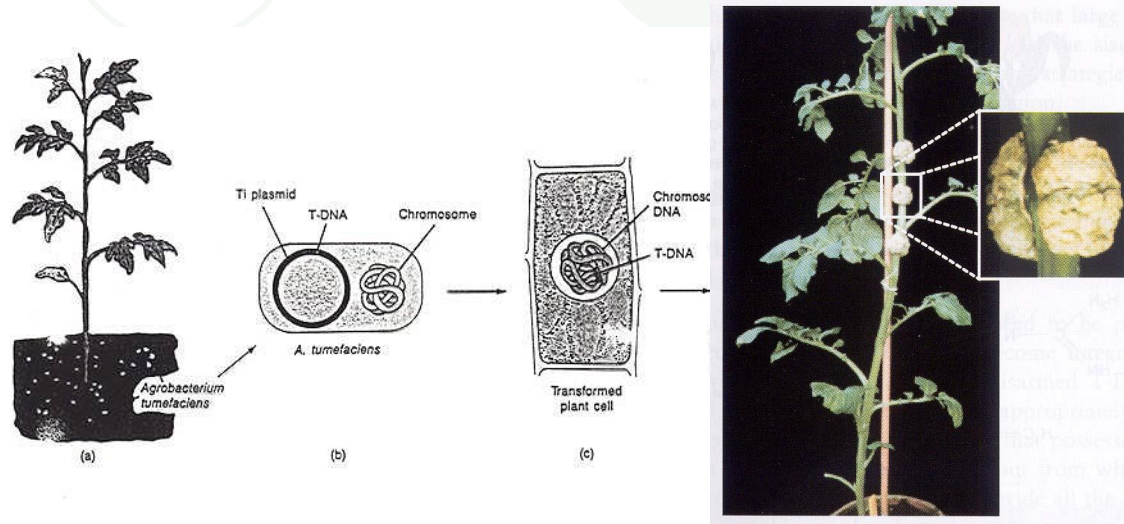
Záměna peptidového linkeru za disulfidický můstek několikanásobně zvyšuje stabilitu scFv a tím zlepšuje jeho terapeutické využití

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 přenáší cizí geny do potomstva

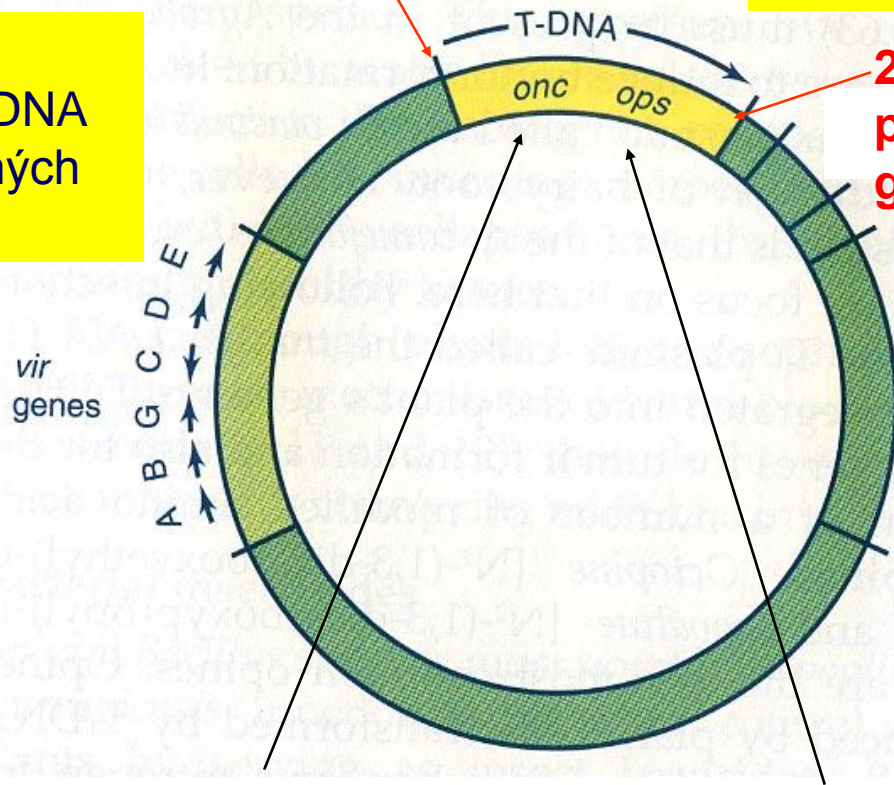
Struktura Ti-plazmidu *A. tumefaciens*

25 bp LB

Část plazmidu přenášená do rostliny

Geny pro přenos T-DNA do rostlinných buněk

25 bp RB = sekvence nezbytná pro začlenění T-DNA do genomu rostliny

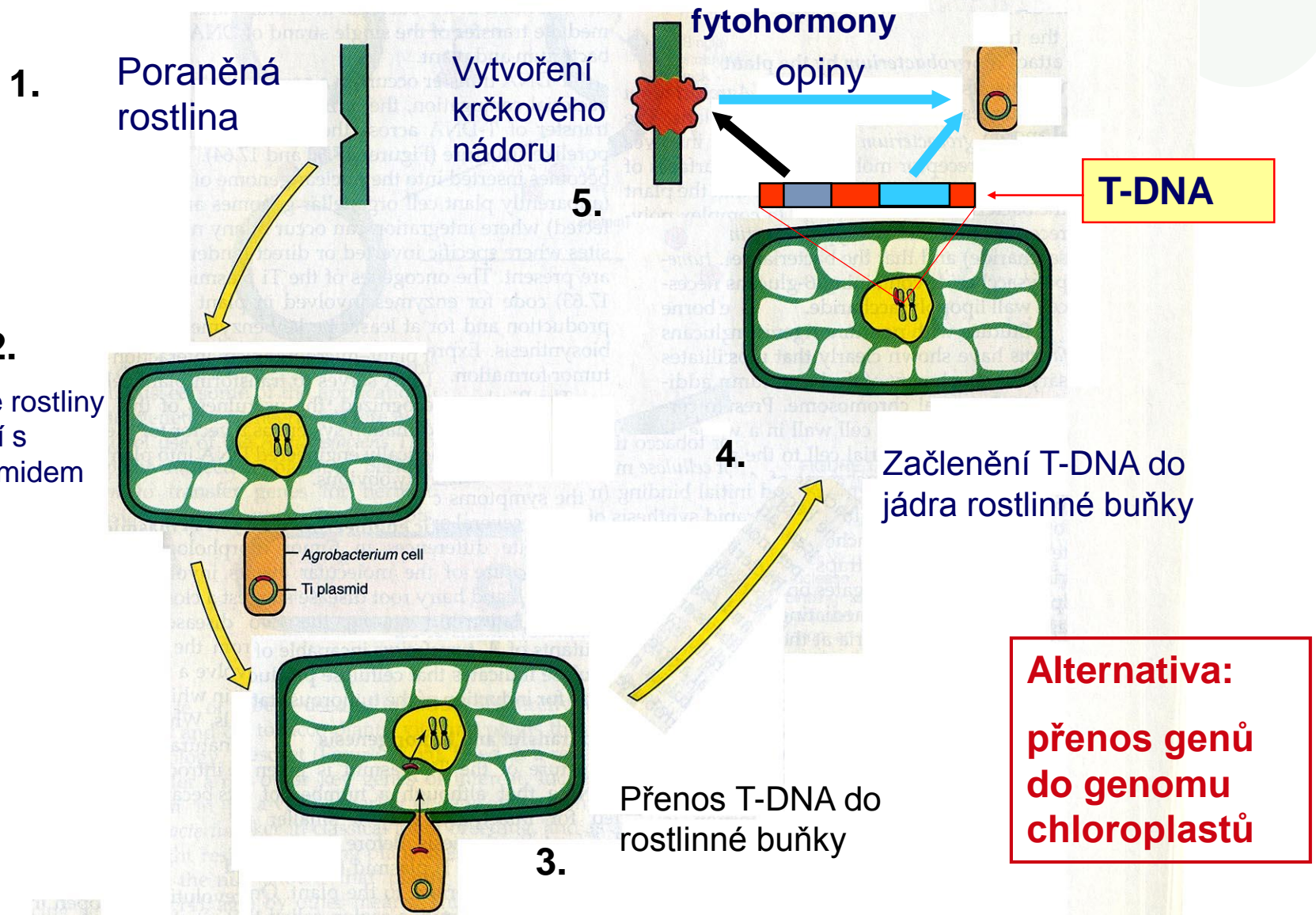


Geny pro katabolismus opinů

Geny zodpovědné za transformaci rostlinných pletiv

Geny zodpovědné za tvorbu opinů v rostlinných buňkách

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

Odstraňování polutantů z prostředí

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

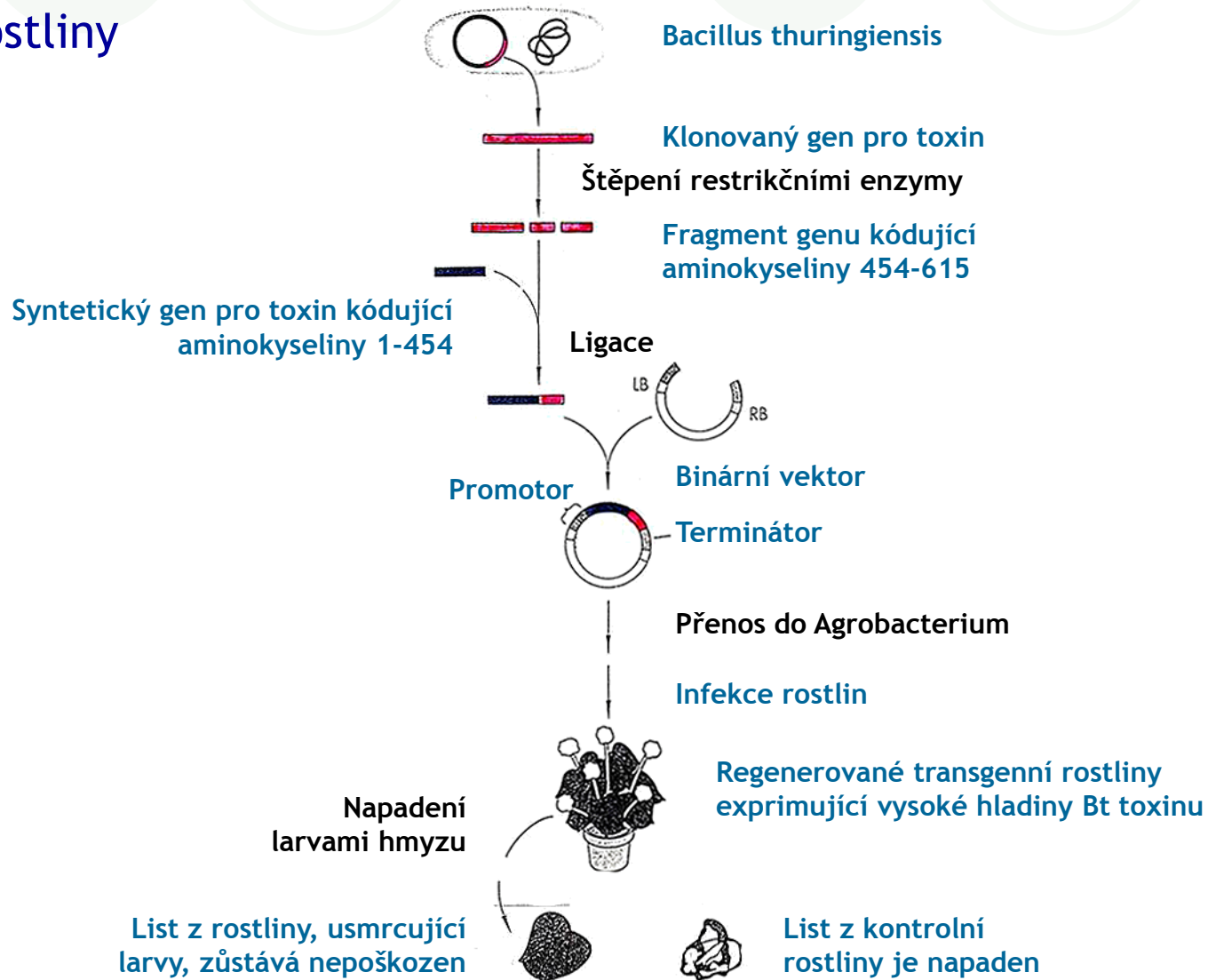
- Rajče FlavrSavr fy Calgene – transgen: antisense mRNA genu pro polygalakturonidasu – prodloužená konzumní zralost
- Rýže – vhodná pro alergiky
- Řepka – olej ze semen obsahující zvýšený podíl kys. Laurové (mýdla a detergenty)
- Řepka – olej ze semen bohatý na myristát (kosmetika) nebo kys. eruková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

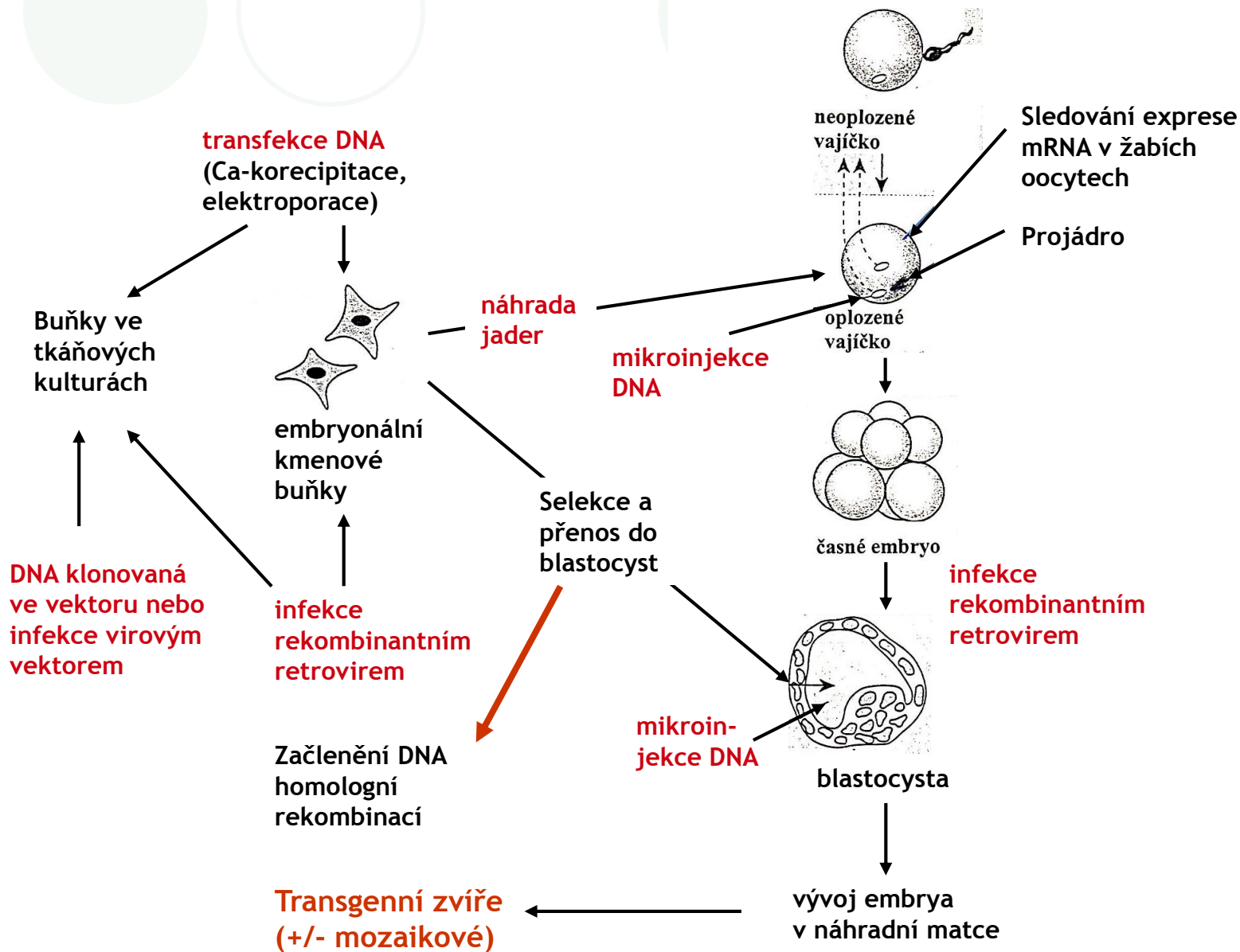
1. Gen(y) podmiňující **odolnost rostlin proti hmyzím škůdcům** (bakteriální gen z *Bacillus thuringiensis* zodpovědný za tvorbu deltatoxinu, který je jedovatý pro některé skupiny hmyzu, ale zcela neškodný pro savce a člověka)
2. Gen pro **odolnost vůči herbicidu Basta** (jeden z nových herbicidů, který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

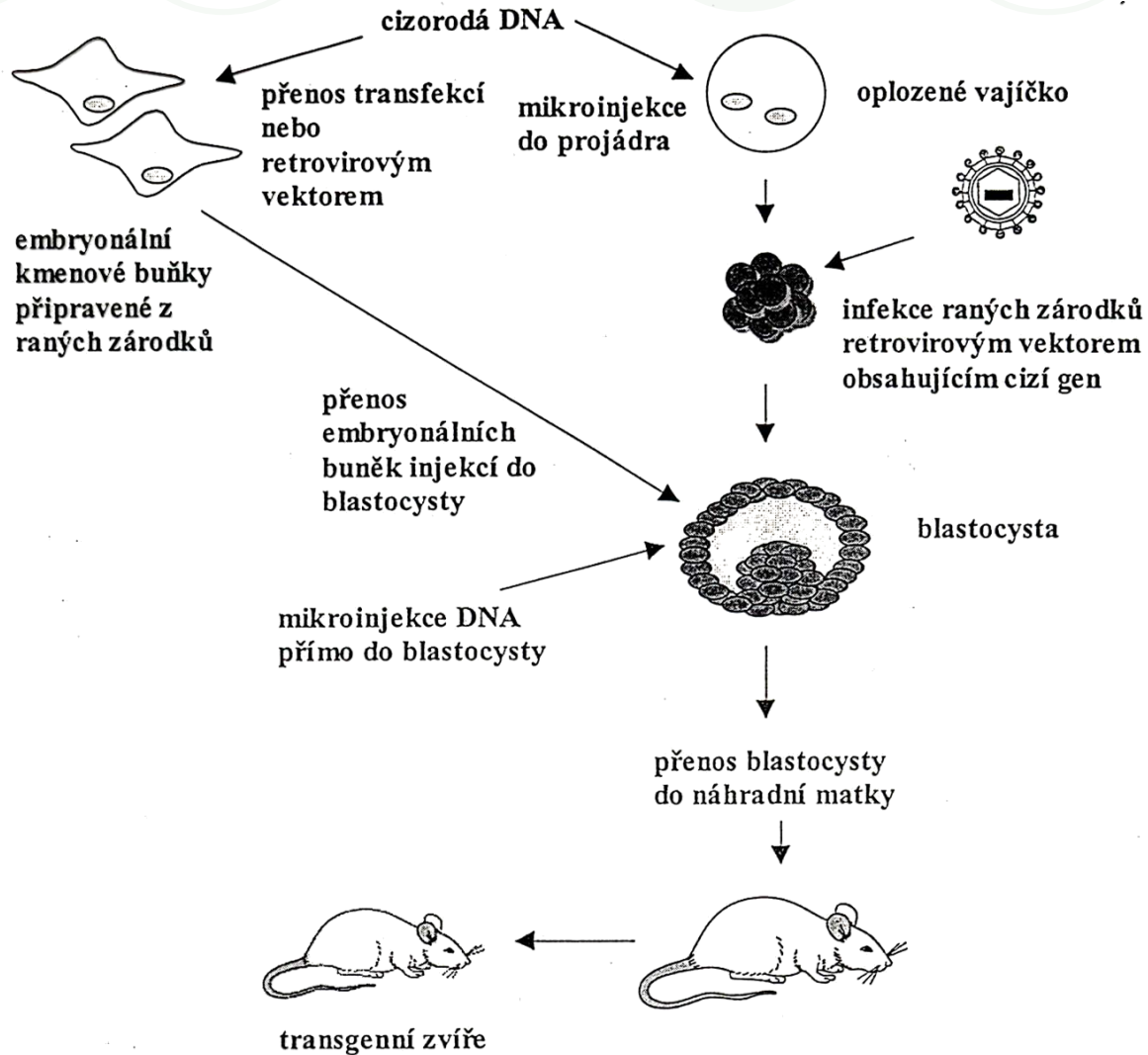
Cíle studia přenosu genů do živočišných buněk

- 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

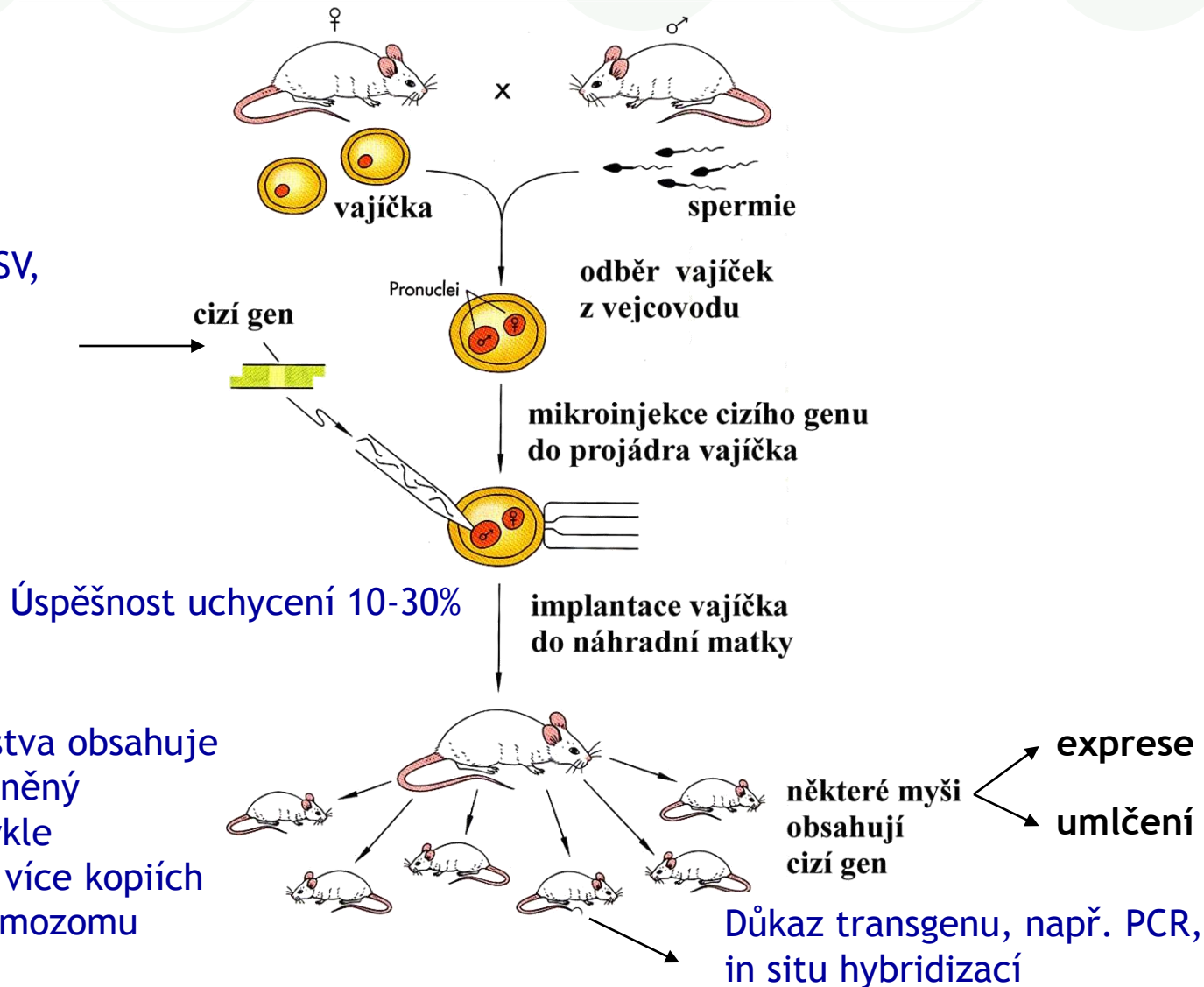


Příprava transgenních savců



Vytváření transgenních myší mikroinjekcí cizího genu do oplozeného vajíčka

DNA SV40, tkHSV, lidský inzulin, B-globin, interferon



Úspěšnost uchycení 10-30%

implantace vajíčka do náhradní matky

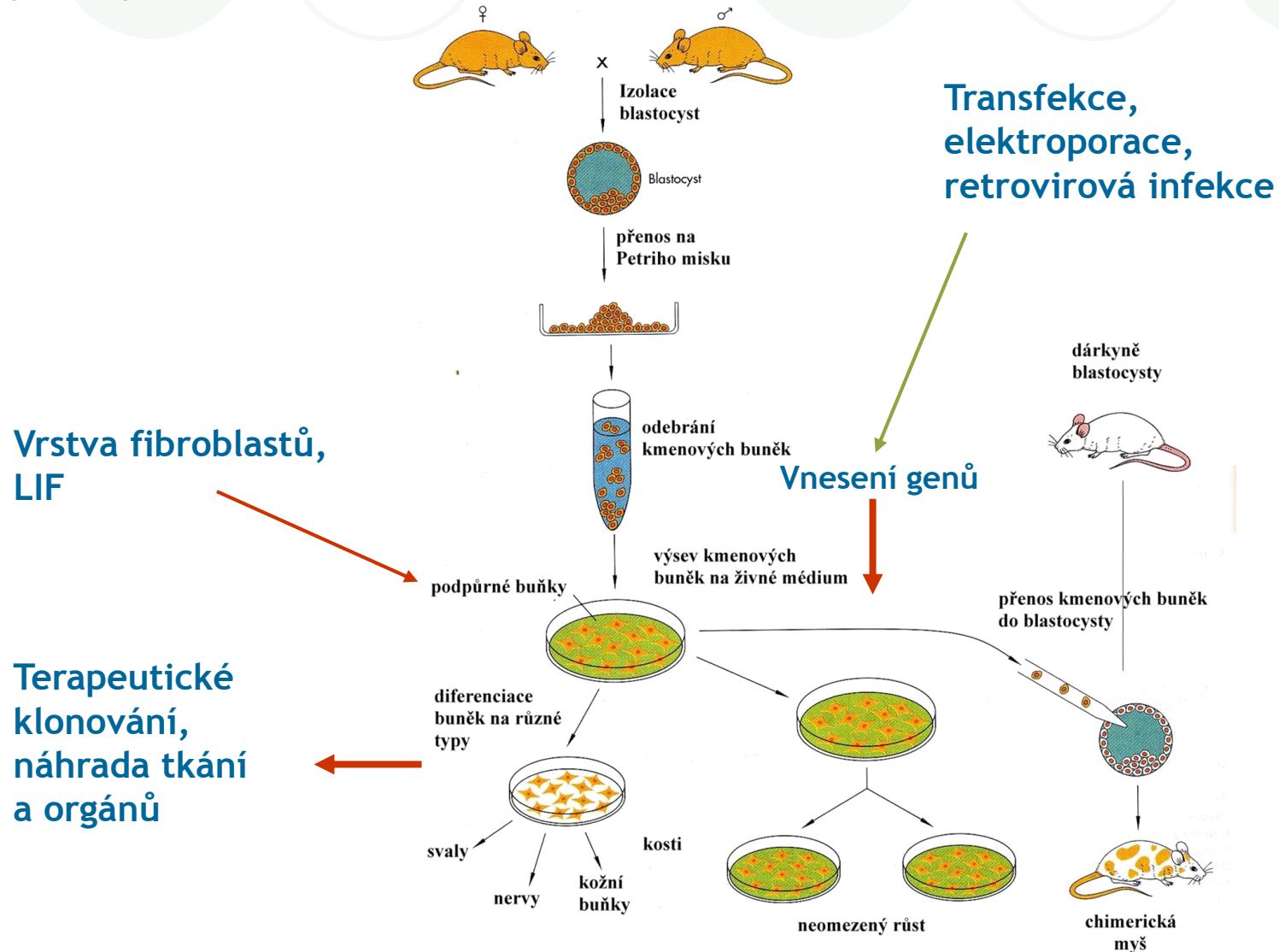
Až 40% potomstva obsahuje transgen začleněný náhodně, obvykle tandemově ve více kopiích v jednom chromozomu

některé myši obsahují cizí gen

- exprese
- umlčení

Důkaz transgenů, např. PCR, in situ hybridizací

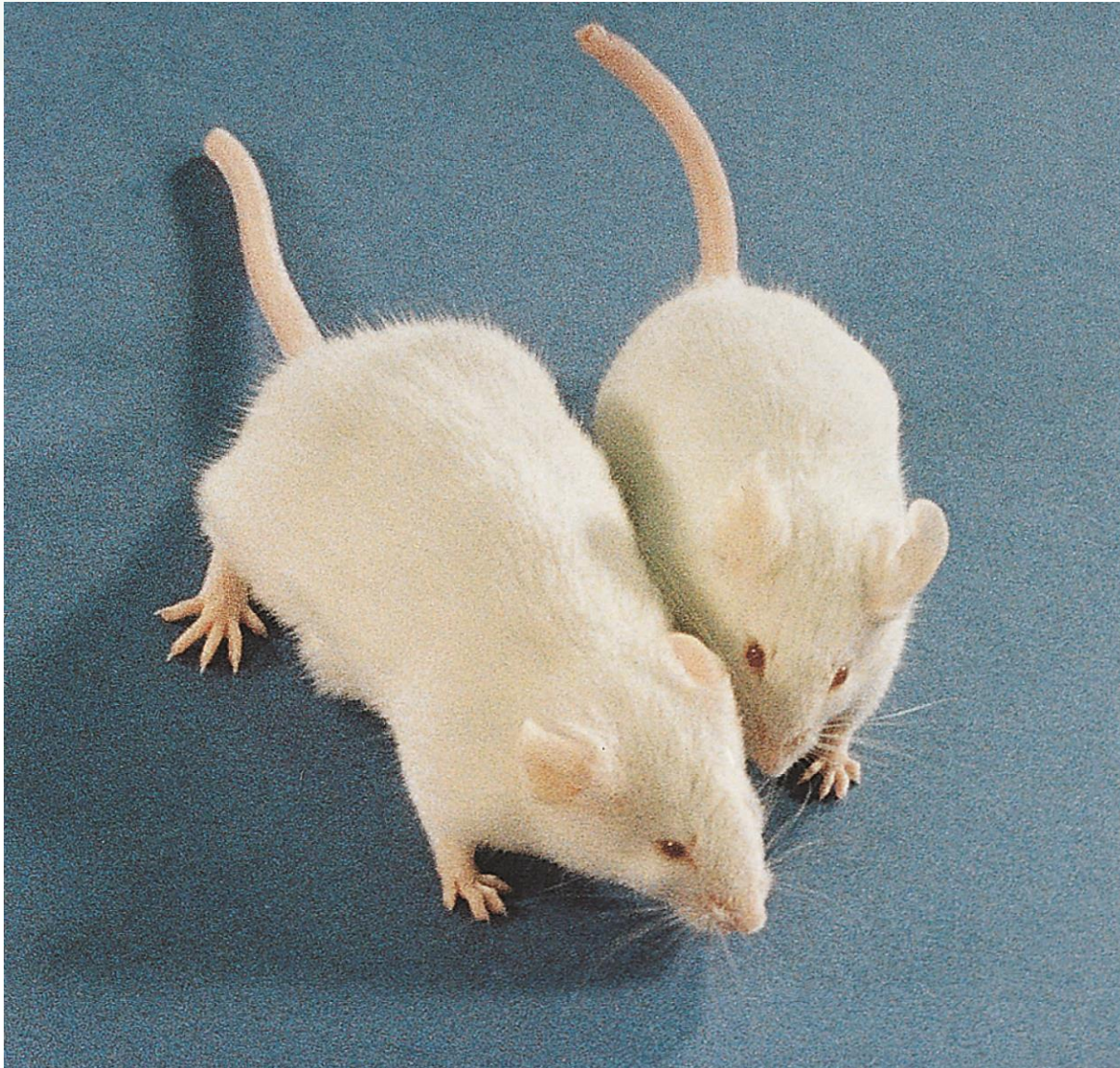
Manipulace s embryonálními kmenovými buňkami



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 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)**

Myš nesoucí gen pro lidský růstový hormon



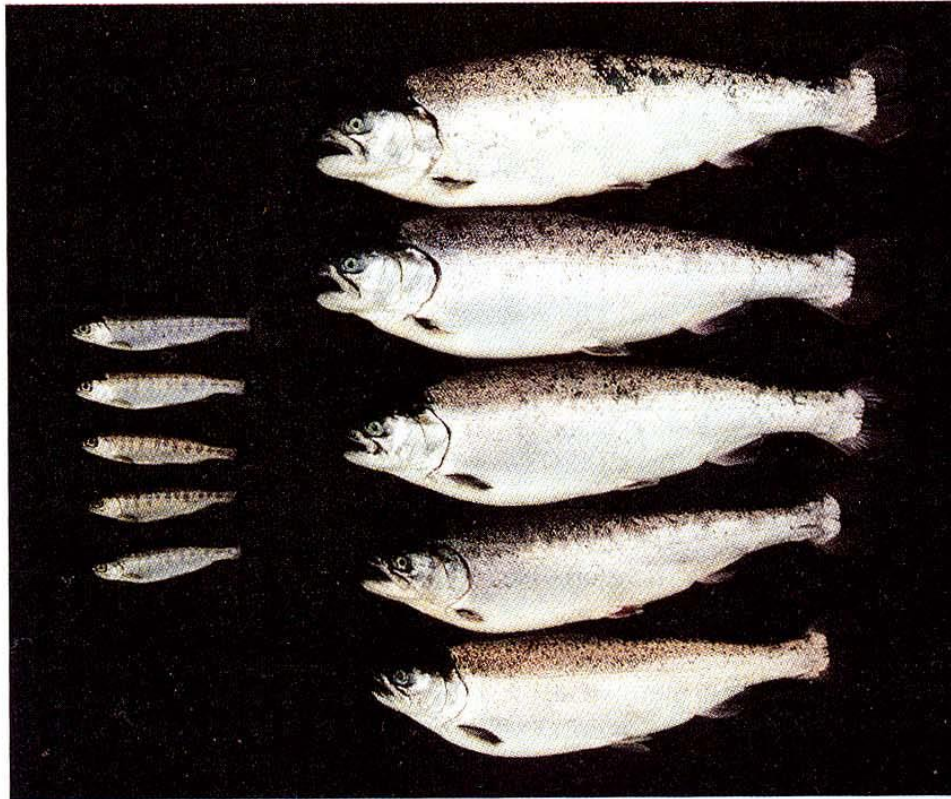


Figure 11.18 Normal coho salmon (left) and genetically engineered coho salmon (right) containing a sockeye salmon growth-hormone gene driven by the regulatory region from a metallothionein gene. The transgenic salmon average 11 times the weight of the nontransgenic fish. The smallest

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

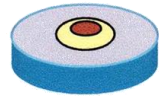
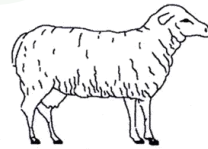
Zvíře	Látka	Využití
ovce	Alfa-1-antitrypsin	Léčba rozedmy plic
koza	Tkáňový aktivátor plazminogenu	Rozpouštění krevních sraženin
ovce	Faktor pro srážení krve VIII, IX	Navození srážení krve
prase	hemoglobin	Náhražka krve při transfúzi
koza	Lidský růstový hormon	Léčba nanismu
ovce, myš	Regulátor CFTR	Léčba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

koza – protein pavoučího vlákna v mléce, atp.

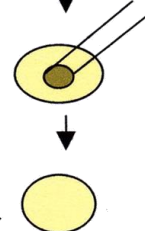
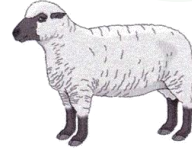
kráva – lysozym **nebo lysostafin** v mléce

Klonování savců doplněné o genetickou modifikaci

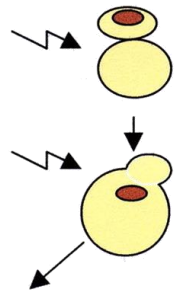
Odebrání buněk z mléčné žlázy bílé ovce a jejich přenos do media se sníženou koncentrací živin



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

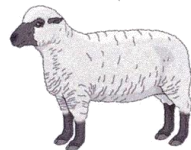


Umístění obou buněk do těsné blízkosti a navození jejich splynutí elektrickým impulzem. Další impulz nastartuje buněčné dělení

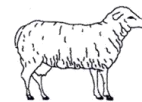


Možnost přenosu cizích genů

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



Možné způsoby léčby genetických onemocnění

1. **Úprava diety - karenční 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

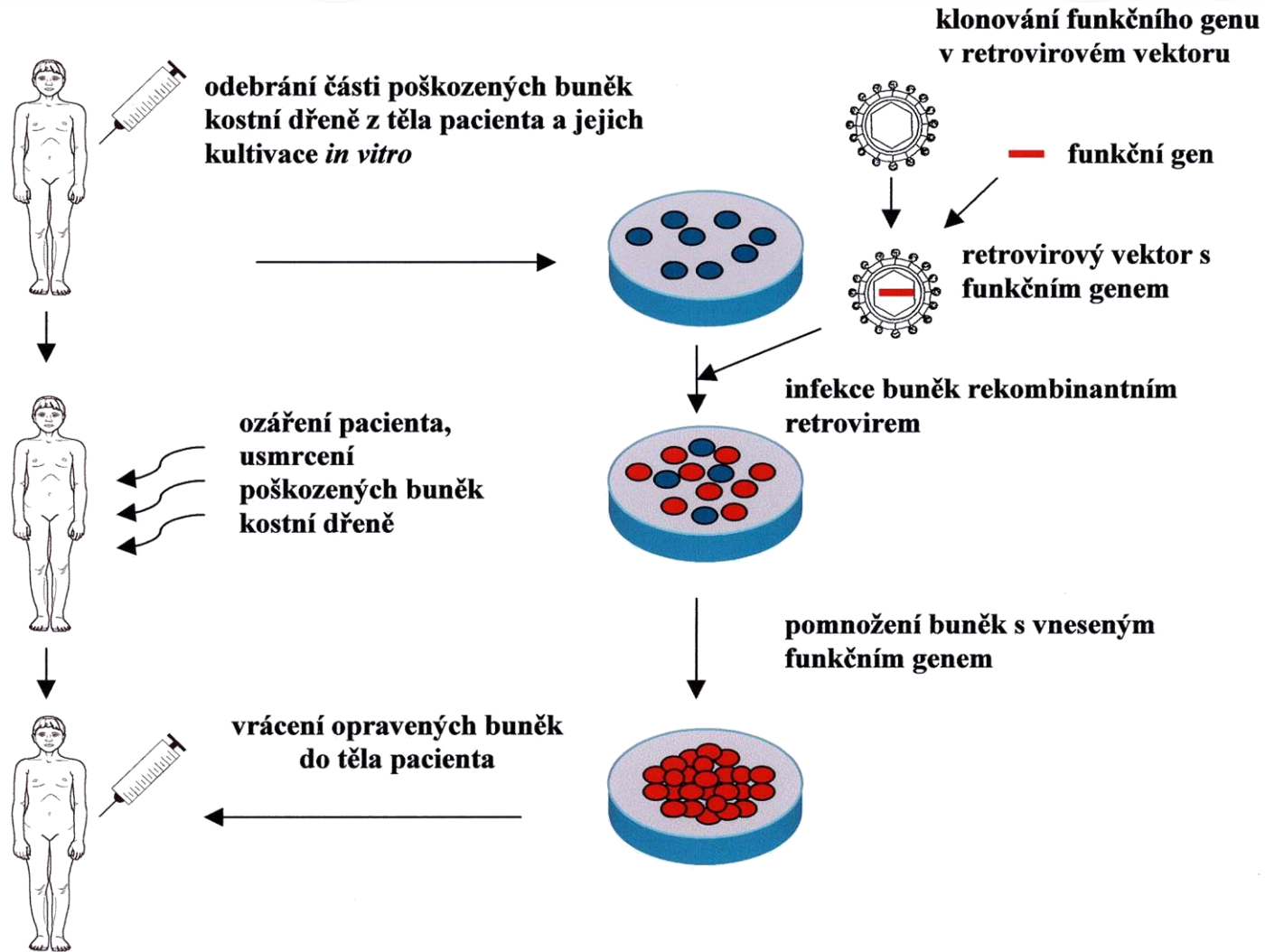
Genové terapie

- 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 adenosindeaminázy (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 adenozeaminázu

*T-lymfocyty
odebrané z pacienta.*

*Infekce T-lymfocytů
retrovirovým vektorem.*

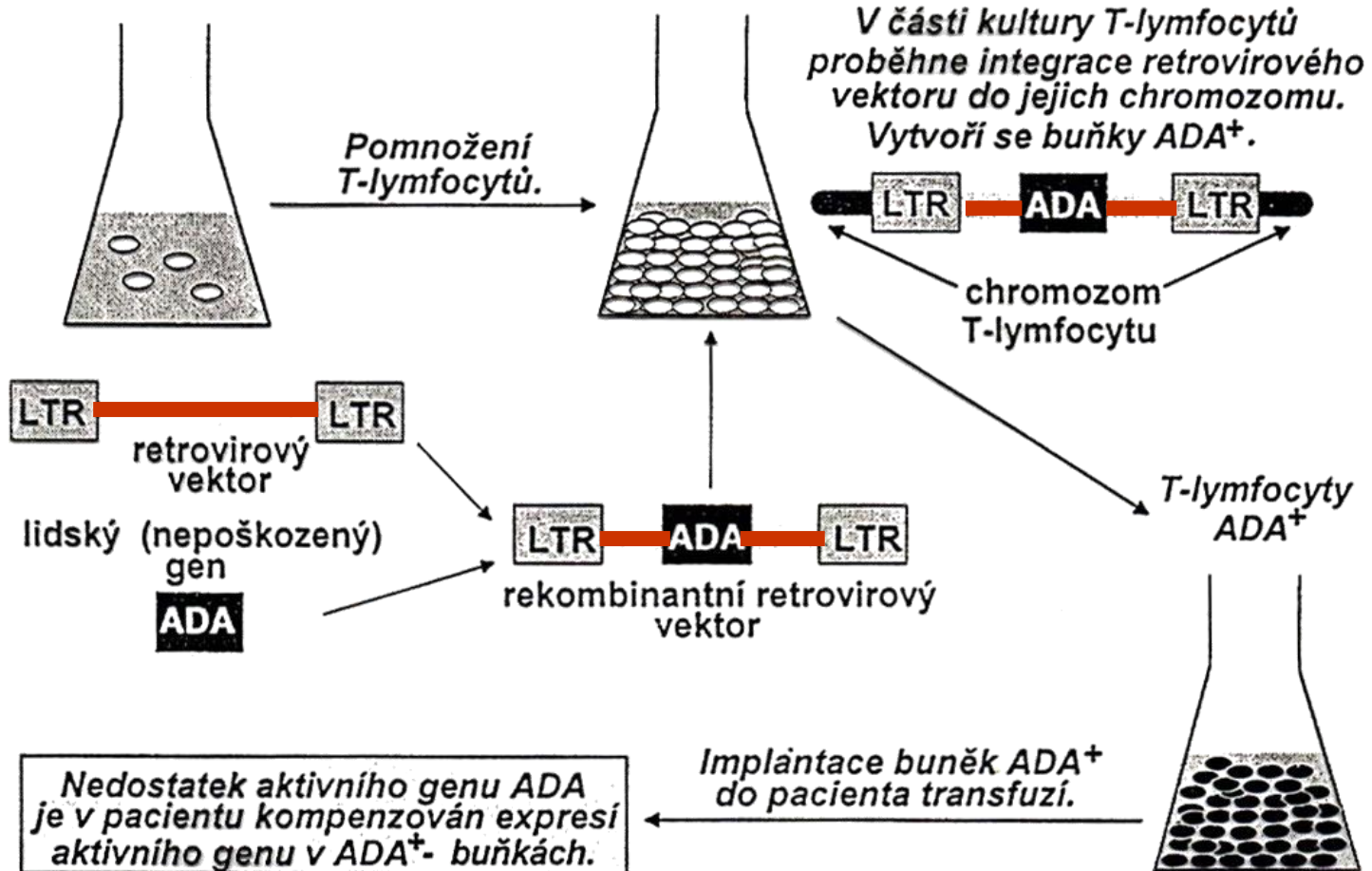
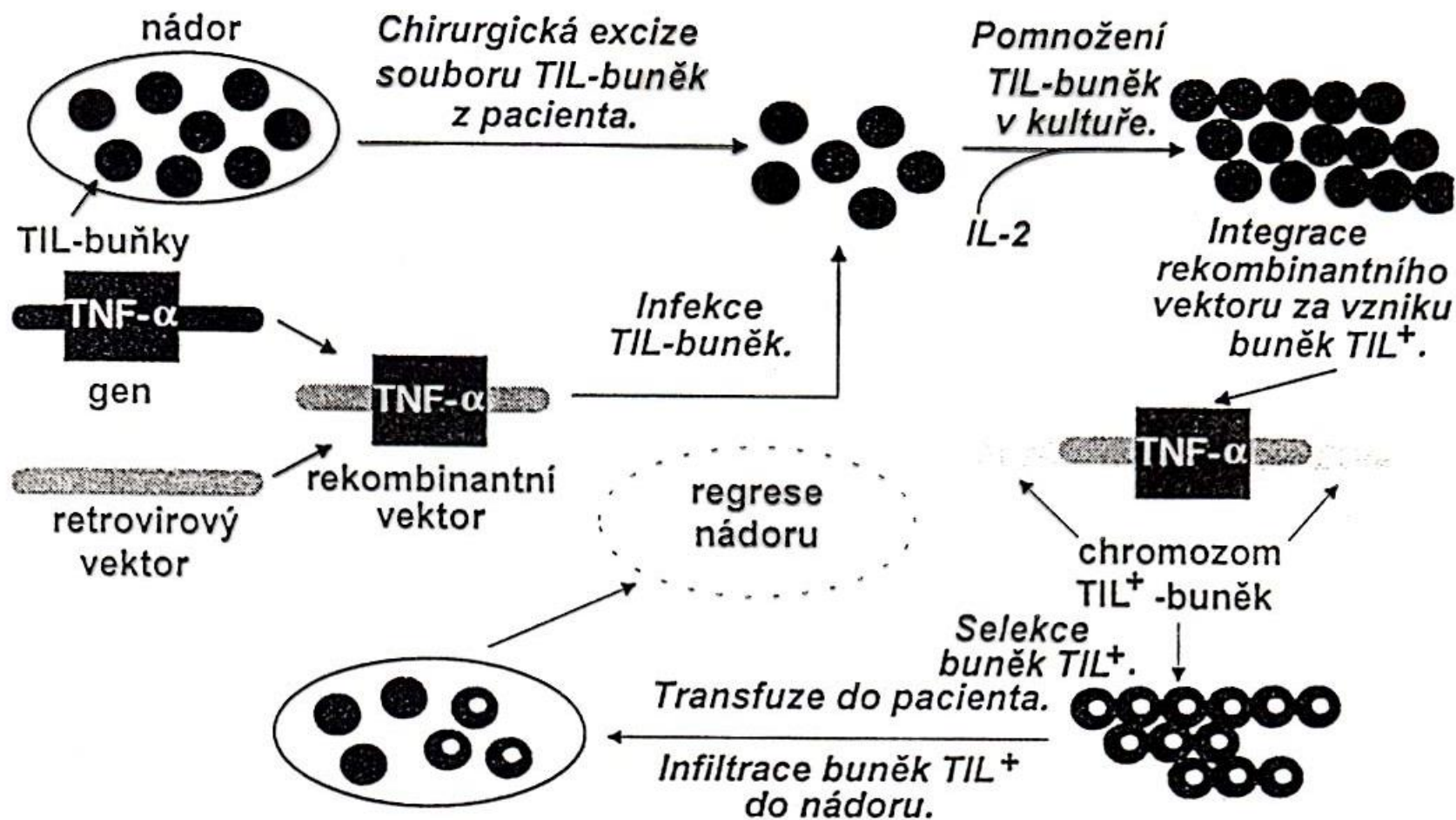


Schéma genové terapie melanomu



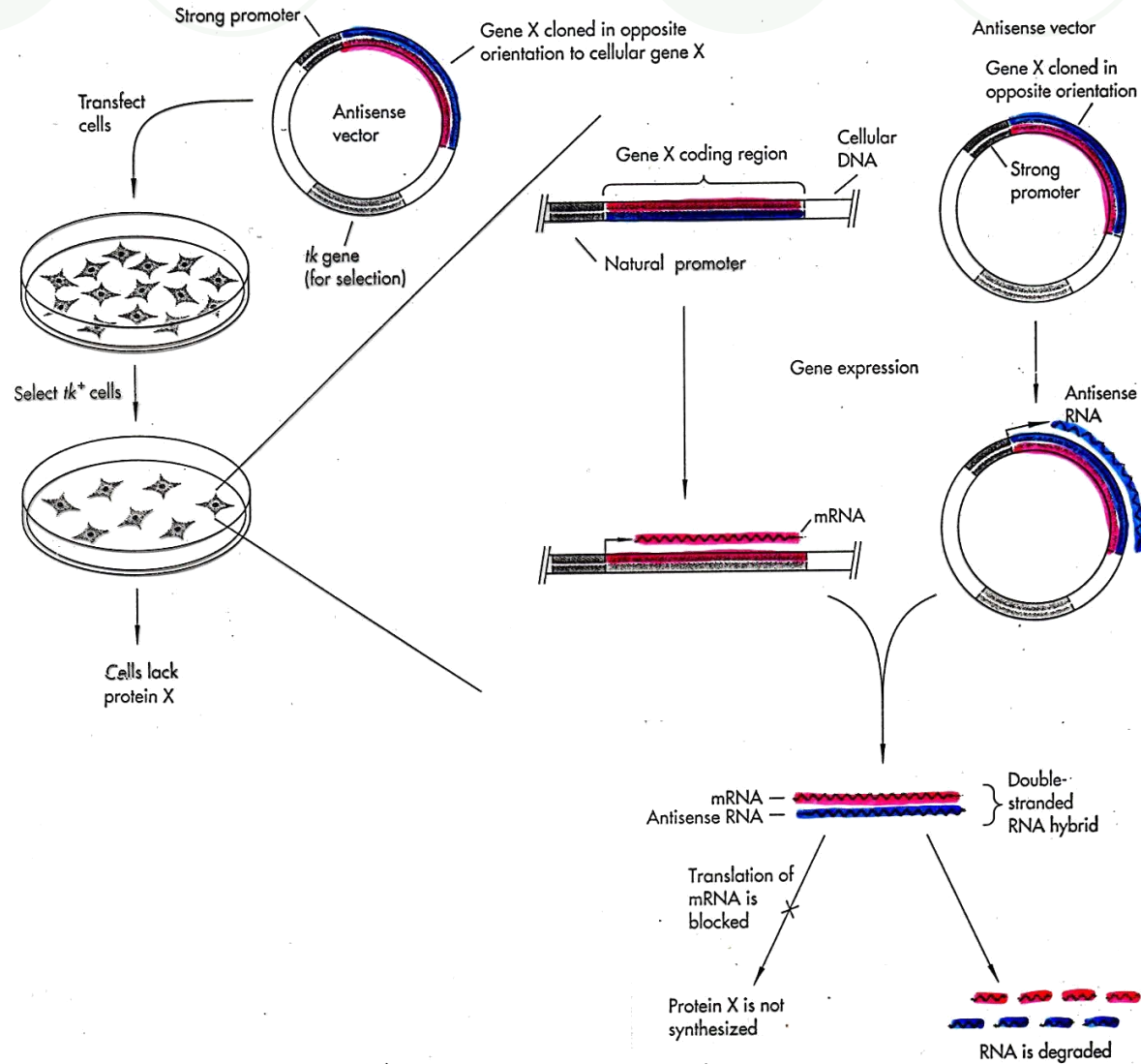
TIL = tumor infiltruující lymfocyty; TNF α = tumor nekrotizující faktor

Viry jako vektory

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

- **Onkoretroviry:** transgen začleňují do chromozomu do dělicích se buněk - výhoda při léčbě nádorů (např. nádory mozku). Riziko inzerční inaktivace endogenů
- **Adenoviry:** infikují nedělicí se buňky, DNA zůstává jako epizom v jádře. Jsou bezpečné, ale exprese je krátkodobá. Problém je imunogenicitá. 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 nedělicí se buňky. Do chromozomu se integrují náhodně - dlouhodobá exprese. Nutnost odstranění virových genů a zachování schopnosti infikovat nedělicí 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

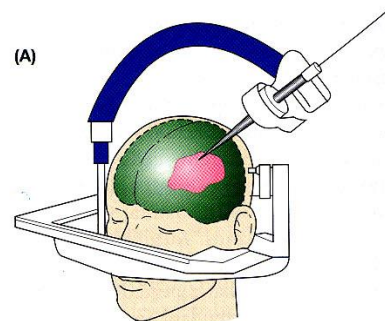
Typ nádoru	Změněné buňky	Použitá strategie genové terapie
Vaječník	Nádorové buňky	Intraperitoneální injekce retrovirů nebo adenovirů s genem p53 nebo BRCA1 – obnova kontroly buněčného cyklu
Vaječník	Nádorové buňky	Injekce adenoviru s scFv protilátkou proti onkoproteinu ErbB2. Snaha o inaktivaci růstového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

Genová terapie nádorů

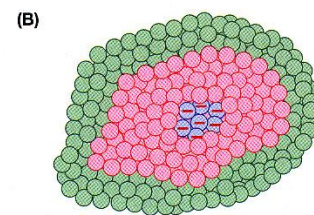
1. Dodání genu: obnova funkce nádorových supresorových genů
2. Inaktivace genu: zábrana exprese aktivovaného onkogenu
3. Genetická manipulace: vyvolání apoptózy nádorových buněk
4. Modifikace nádorové buňky tak, aby byla více antigenní a byla zničena imunitním systémem
5. Modifikace dendritických buněk 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**

Genová terapie *in vivo*

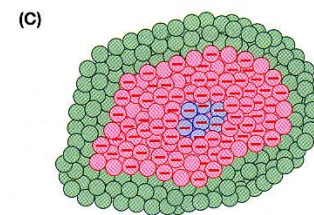
Do nádoru jsou injikovány buňky, do nichž byl *in vitro* vnesen retrovirový vektor, který obsahuje gen pro tymidinkinázu (TK). Vektor se uvolňuje a infikuje okolní nádorové buňky, v nichž se pak vytváří TK (retrovirus je schopen infikovat jen dělicí se buňky!). Do těla pacienta je intravenózně podána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



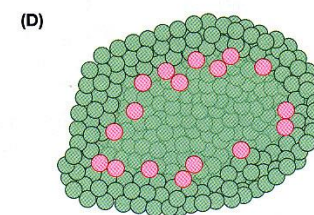
(A) MRI-guided stereotactic implantation of vector producer cells (VPC) into CNS tumors *in situ*



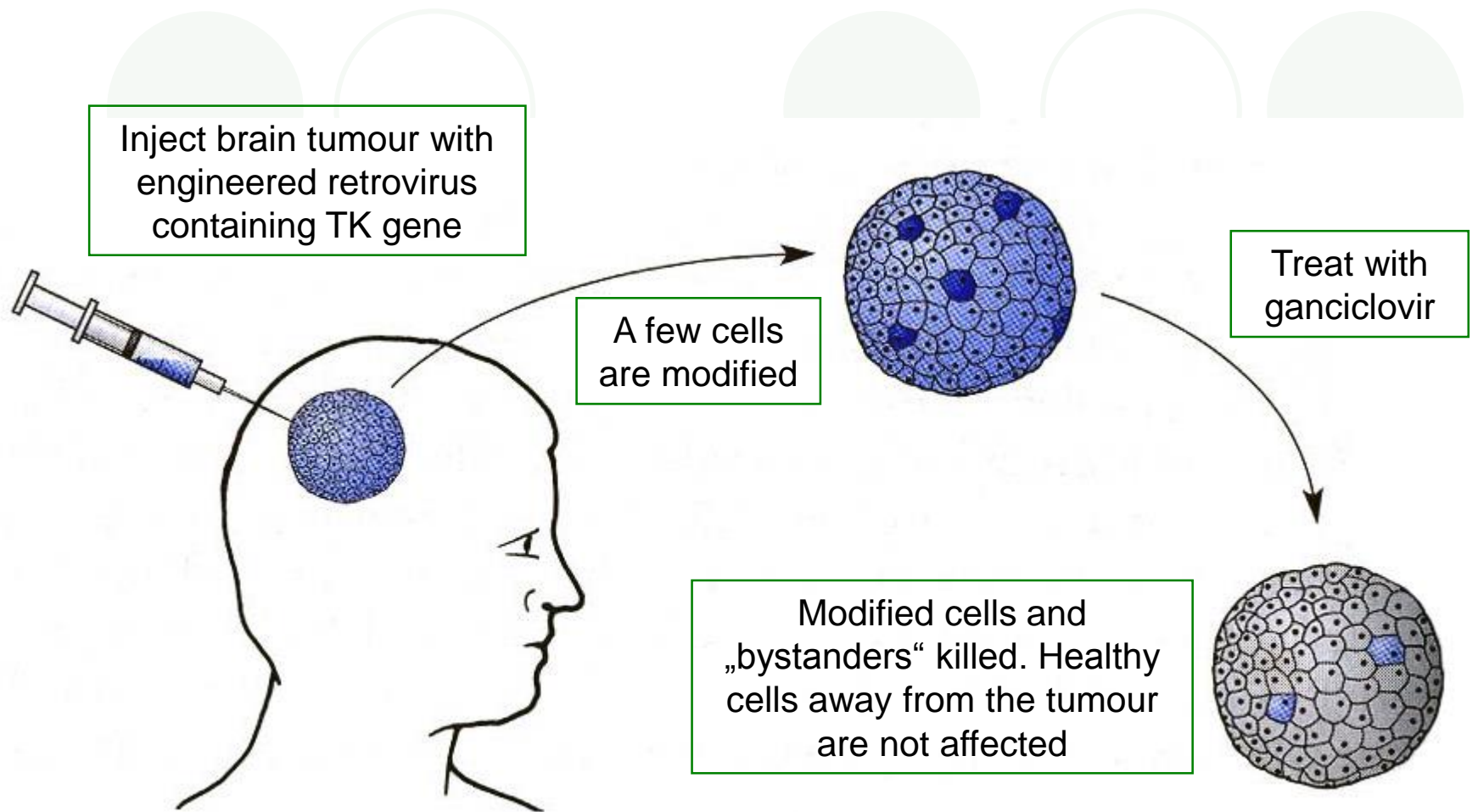
(B) Vector producing cells inside the tumor



(C) Retroviruses infect tumor cells but not normal cells



(D) Gancyclovir kills the infected cells



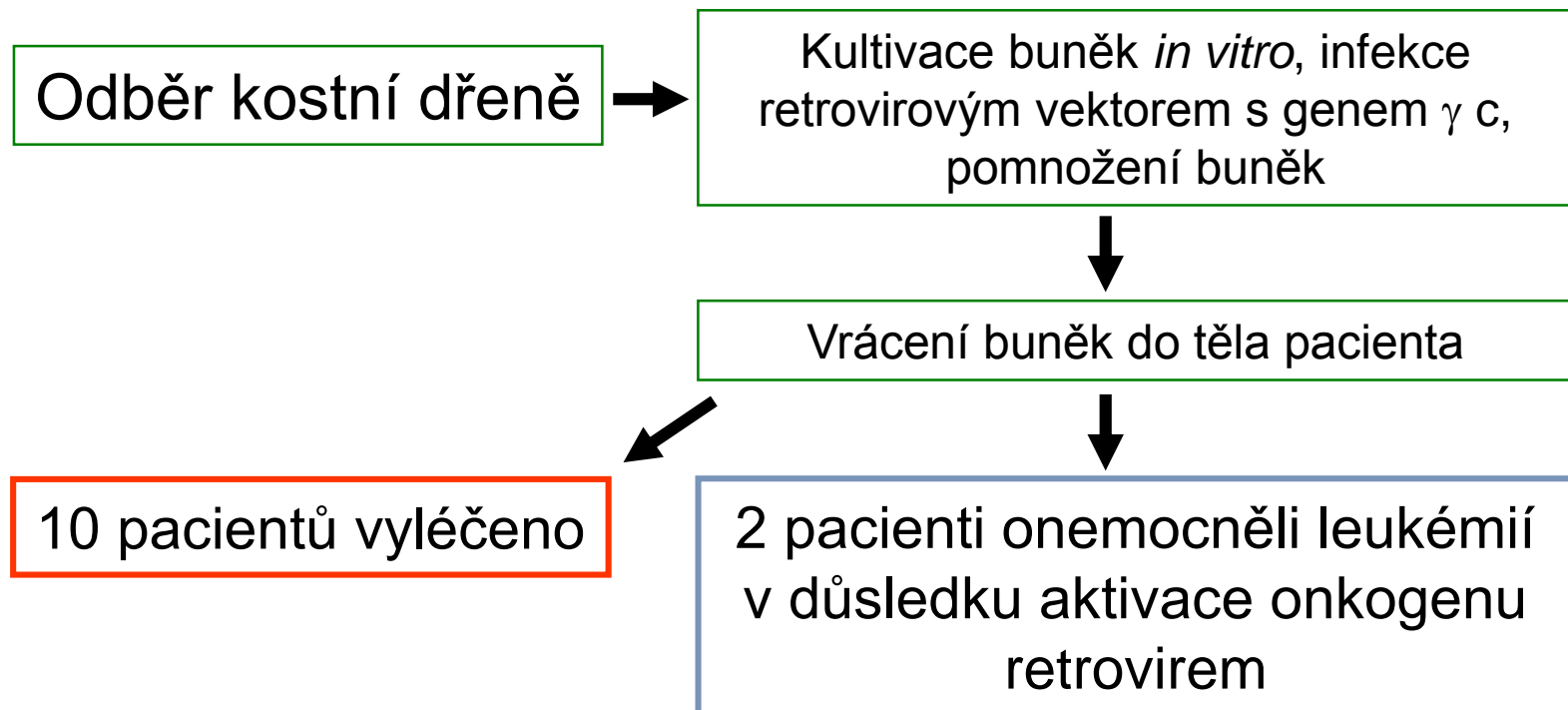
Genová terapie mozkových nádorů: do nádoru je injikován retrovirový vektor obsahující enzym tymidinkinázu (TK). Několik nádorových buněk přijme vektor (tmavomodrá) a v těchto buňkách pak tymidinkináza konvertuje ganciklovir (prekurzor léčiva) do aktivní formy a v důsledku toho buňky umírají. Jsou usmrceny i nádorové buňky v okolí, ale zdravé buňky postiženy nejsou.

Příklad úspěšné léčby chorob genovou terapií

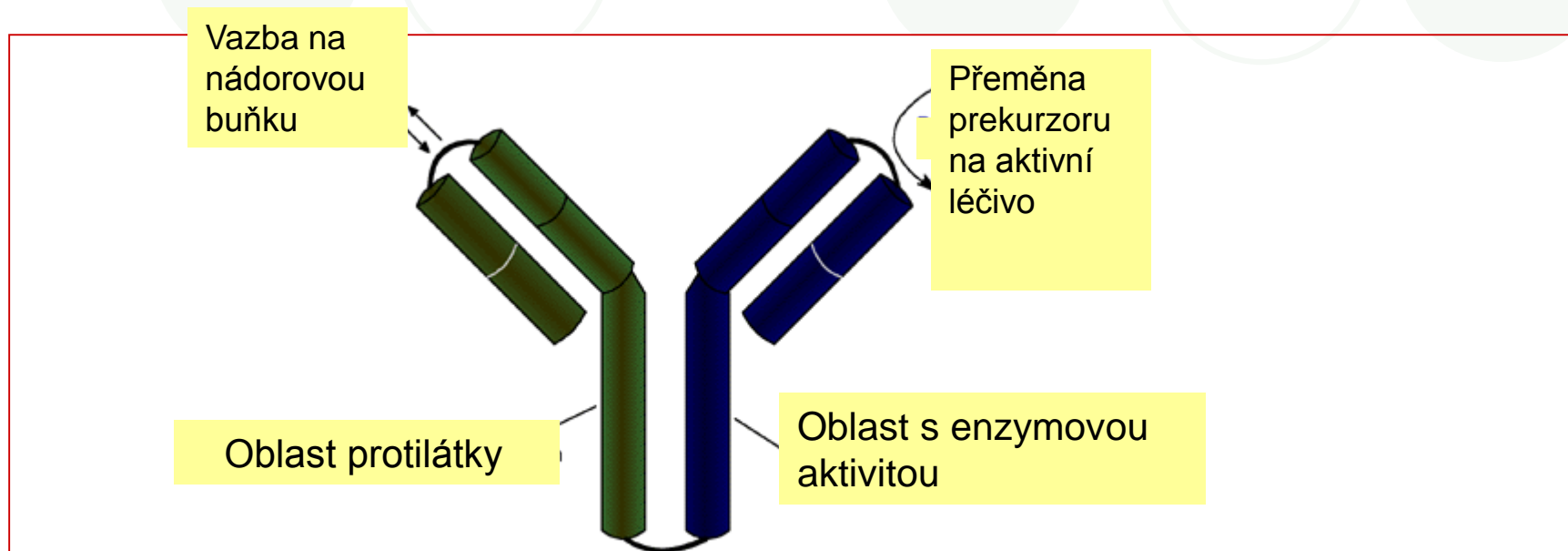
X-SCID – těžká kombinovaná imunodeficience vázaná na X

chromozom: mutace genu kódujícího γ c-řetězec receptoru pro interleukin 2, která zabraňuje normálnímu vývoji T-lymfocytů a „killer“ buňkám

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

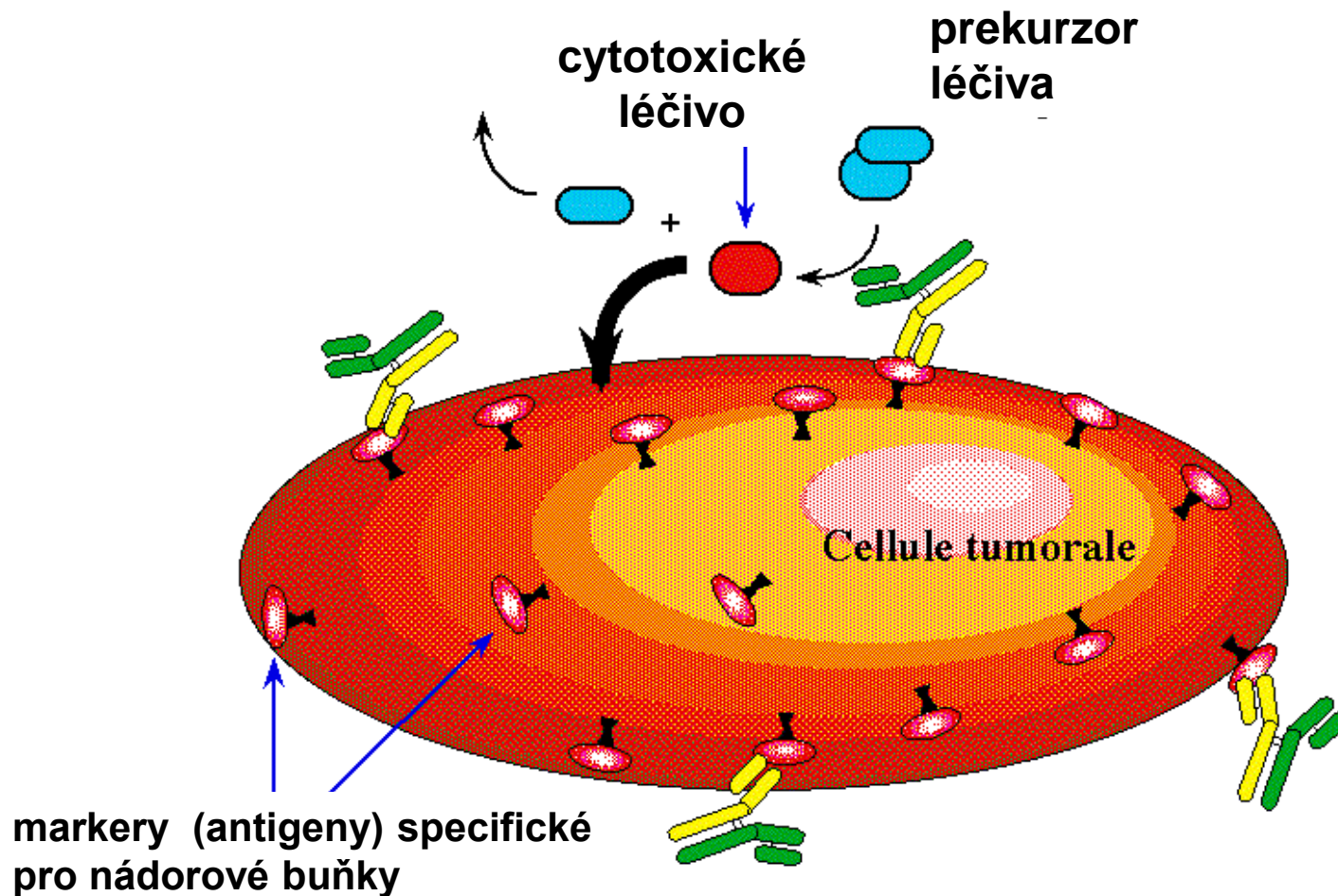


Struktura abzymu pro destrukci nádorových buněk

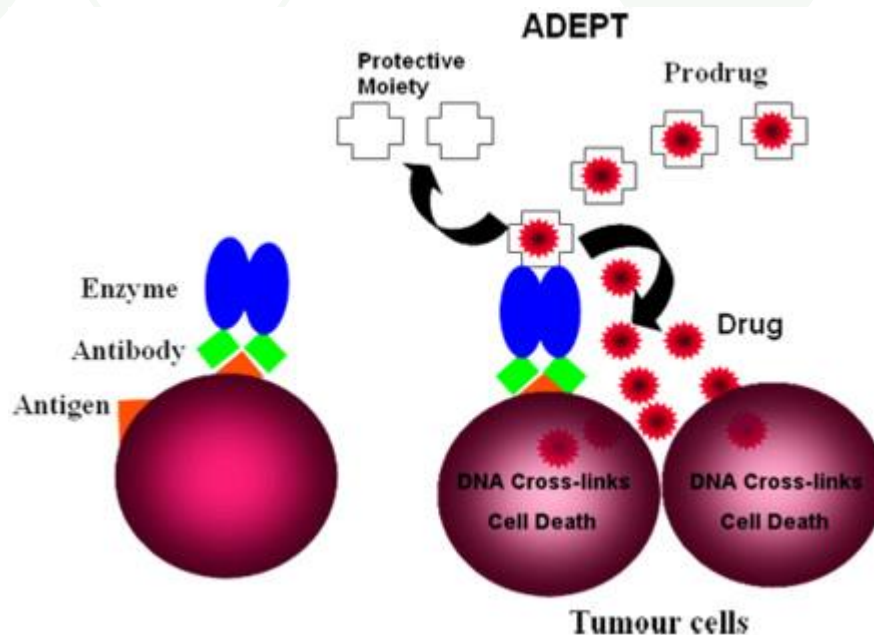


Aplikace: abzym je injikován do pacienta, kde se svou protilátkovou oblastí váže na nádorové buňky. Následně je do krevního řečiště vpraven prekurzor léčiva, který je enzymovou aktivitou abzymu konvertován na aktivní léčivo. To působí jen na nádorovou buňku, na níž je abzym navázán. Tím jsou selektivně destruovány jen nádorové buňky a nikoliv normální buňky, na něž se abzym neváže.

Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy (ADEPT) – enzymová aktivita abzymu aktivuje prekurzor léčivé látky a tu pak dopravují do blízkosti nádorové buňky



Princip Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy (ADEPT)



Protilátka (abzym) dopraví enzym k receptorům na nádorových buňkách, kde enzym konvertuje netoxický prekurzor (prodrug) na látku, která účinně nádorové buňky usmrcuje. Tím je omezen toxický účinek na normální buňky.