
B I P R O S P E C T

Dvacátýdruhý ročník
Číslo 2/2012

Adresa společnosti: VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, tel.: 220 443 151, fax: 233 334 769, e-mail: Danka.Pokorna@vscht.cz, IČO 00570397, číslo účtu: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

**zakládajícího člena Českého svazu
vědeckotechnických společností
(ČSVTS)**

**a
člena „European Federation
of Biotechnology“ (EFB)**

Redakční rada

Ing. Petra Lipová, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor in Chief)

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Prof. Ing. Alena Čejková, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Milan Fránek, DrSc.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70, 621 32 Brno

Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Vladimír Vala
Teva, Ostravská 29, 747 70 Opava

Ing. Jan Kopečný, DrSc.
(Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.
(Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci)

Doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc.
(Ústav biochemie, PřF MU, Brno)

RNDr. Ivan Babůrek, CSc.
(Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.
(Katedra biochemie PřF UK, Praha)

Doc. Ing. Radovan Bílek, CSc.
(Endokrinologický ústav, Praha)

BIOPROSPECT

22th Volume
No. 2/2012

Society address: Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech and Slovak Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both

research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. In each issue there will be advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared on the Czech and Slovak market, or are projected enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperations with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech and Slovak Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech and Slovak biotechnologists.

For more information contact the editorial board or directly:

Petra Lipovová, PhD. (editor in chief)
ICT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

dostáváte do rukou druhé číslo letošního Bioprospectu, které obsahuje stručnou verzi prezentací přednesených na našem tradičním semináři „Novinky v oblasti genetických modifikací“, který se uskutečnil na VŠCHT v Praze dne 22. května 2012. Jistě Vás zaujmou příspěvky Radka Sedláčka z ÚMG AV ČR, v.v.i., Moniky Baxa z ÚŽFG AV ČR, v.v.i. a Bohdana Schneidera z Biotechnologického ústavu AV ČR, v.v.i. Soubor těchto přednášek z oblasti genetiky je doplněn velmi zajímavým přehledem Ludka Eyera a Milana Fránka z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. v Brně na aktuální téma nanoprotilátek a stručným přehledem o biotechnologických systémech pro jednorázové použití, které si nyní úspěšně razí cestu do biotechnologické výroby. Jako novinku uvádíme v tomto čísle krátké zajímavé informace z biotechnologií v nové rubrice „Víte, že ...“. Budeme rádi, když budete do této rubriky přispívat, což je jistě pohodlnější než napsat článek.

Rádi bychom Vám znovu připomněli, že je Vám stále k dispozici web našeho loňského mezinárodního symposia (www.biotech2011.cz), kde si můžete prohlédnout fotografickou dokumentaci. Také jsme Vás informovali, že 10 vybraných přednášek ve formě přehledných článků vyjde ve zvláštním čísle prestižního časopisu Biotechnology Advances. Články si již nyní můžete přečíst na portálu www.sciencedirect.com. Po otevření zadáme Biotechnology Advances a naše články jsou v rubrice „Articles in press“, koncem roku budou zařazeny pod Volume 31. Časopis má za r. 2011 impact faktor 9,646, zatímco v r. 2010 měl 7,600. Naše symposium plánujeme opakovat v době od 11. do 13. 6. 2014 opět pod názvem BIOTECH 2014 a 6. Česko-švýcarské symposium. Vaše náměty a podněty posílejte na adresu naší společnosti.

Jak jsme Vás informovali, proběhnou v letošním roce volby Rady a revizní komise poprvé korespondenčním způsobem (e-mailem nebo písemně). O organizaci voleb budou všichni členové uvědomeni dopisem. Vaše nominace můžete posílat na adresu: danka.pokorna@vscht.cz (resp. poštou na adresu Ing. Dana Pokorná, CSc., Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT, Technická 3, 166 28, Praha 6). Na tyto adresy laskavě posílejte změny poštovní adresy (posílání Bioprospectu) i e-mailové adresy (pro snadnější komunikaci). Chcete-li být zařazeni do informačního servisu, uveďte to výslovně.

Připomínáme, že informace o aktivitách EFB lze nalézt na webu www.efb-central.org a a nejbližším evropském biotechnologickém kongresu, který se uskuteční 23. – 26. 9. 2012 v Istanbulu na adrese www.ecb15.org. Pro příští rok můžeme doporučit 13. – 14. 3. 2013 „Forum Life Science“ v Mnichově (www.bayern-innovativ.de/fls2013). Z mezinárodních aktivit v příštím roce je jistě zajímavý „World Biotechnology Congress 2013“, který se uskuteční 3. – 6. června 2013 v Bostonu, USA (<http://www.worldbiotechcongress.com>). Na programu tohoto čtyřdenního jednání je farmaceutická biotechnologie, biotechnologie zemědělská a životního prostředí, průmyslová biotechnologie, lékařská biotechnologie a řada dalších aspektů biotechnologií.

Rádi bychom Vás informovali o možnosti účasti na společné expozici České republiky na výstavě BIO CHINA 2012, která se koná 24. – 25. 10. 2012 v Šanghaji. Více informací o veletrhu BIO CHINA můžete nalézt na webu: <http://www.bio.org/events/conferences/bio-convention-china>. Expozice se bude realizovat za podpory Hospodářské komory ČR, která každé firmě, jež splní podmínky účasti, vyplátí podporu až do výše 120 tisíc korun bez DPH na jednu akci a účastníka na přímé náklady spojené s veletržní expozicí. Více informací o podmínkách stanovených Hospodářskou komorou najdete zde:

<http://www.komora.cz/podpora-exportu-a-zahranicni-vztahy/veletrhy-a-vystavy-v-zahranici/informace-o-projektu-1/informace-o-projektu-2/casto-kladene-otazky-faq/casto-kladene-otazky-faq.aspx>

Z domácích událostí bychom Vám rádi znovu připomněli, že ve dnech 11. – 13. 9. 2012 bude Zahradnická fakulta v Lednici pořádat národní konferenci Aplikované rostlinné biotechnologie ke 100. výročí založení geneticko-šlechtitelského pracoviště Mendeleum v Lednici. Bližší podrobnosti naleznete na webu:

<http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/571/konference>.

Přejeme Vám krásné prožití zbytku léta a těšíme se na další spolupráci. Zejména rádi uvítáme Vaše příspěvky do Bioprospectu, včetně informací o Vámi organizovaných akcích i o tom co Vás v problematice biotechnologií zaujalo.

S mnoha pozdravy Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová

VÍTE, ŽE

- Evropská Unie oznámila oficiální definici nanočástic?
- podle předpovědi budou v příštím desetiletí v oblasti prodeje analog biofarmaceutik („biosimilars“ a „follow-on biologics“) dominovat monoklonální protilátky, protizánětlivé fuzní proteiny (AIFPs = anti-inflammatory fusion proteins), insulin, erythropoetiny, interferony, růstové hormony a G-CSF (granulocyte colony stimulating factor)
- ugandští vědci úspěšně pracují na genetických modifikacích banánů, kasavy, sorga a kukuřice. Vzhledem k tomu, že v r. 2006 Uganda přijala regulační legislativu po evropském vzoru, jsou všechny geneticky modifikované plodiny zatím pěstovány ve stadiu polních pokusů. Nicméně je zajímavé jak samostatně si ugandští vědci počínají. Kromě toho byl v r. 2010 testován v polních pokusech Bt-bavlnník fy. Monsanto (<http://www.saworldview.com/artical/the-bananas-bellweather>, www.biotech-now.org)
- krevní tlak ovlivňují genetické faktory. Pod vedením vědců z university v Gotenburgu bylo studiem na 200 000 Evropanech identifikováno 16 nových genetických variant, které ovlivňují krevní tlak.
- Colorado vydalo zákaz používání trans-tuků nejen pro školní obědy, ale i snídaně a svačiny, jakož i zákaz prodeje takových potravin ve školních automatech. Důvodem tohoto nejprísnějšiho opatření ze všech států USA je údajně největší počet obezních dětí v tomto státě (www.denverpost.com/education/ci_19771718)
- Pokrok ve vývoji lithiových baterií prý umožní od r. 2017 prodej kolem 100 000 elektrických autobusů a trajlerů ročně (www.cen-online.org, C&EN February 6, 2012, p. 6)
- Nanoklastry umožní zlepšit podávání proteinových léčiv ve formě koncentrovaných, injikovatelných suspensí (ACS Nano, DOI: 10.1021/nn204166z)
- Německá společnost BASF oznámila, že končí s produkcí GM plodin pro evropský trh a přesune své aktivity do USA. Uzavře i svou pobočku ve Švédsku. Zastavení výroby se týká i GM brambor Amflora. (<http://europeanvoice.com>)
- Na evropském biotechnologickém kolbišti se hlásí o slovo další asociace „European Biotechnology Thematic Network Association“ (EBTNA) registrovaná v Itálii a se sídlem na universitě v Perugii (<http://www.ebtna.net/home.htm>)
- USDA's Animal and Plant Health Inspection Service (USA úřad) schválila k polním pokusům první plodinu rezistentní vůči suchu, a to kukuřici MON 87460 firmy Monsanto. Očekává se, že tato odrůda nalezne uplatnění zejména v suchých oblastech amerického západu. (C&EN January 2, 2012, p.18)

TRANSGENIC MINIATURE PIG AS A MODEL FOR THE STUDY OF HUNTINGTON'S DISEASE

Monika Baxa

Laboratory of Cell Regeneration and Plasticity, Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR, v.v.i., Libečkov;
baxa@iapg.cas.cz

Neurodegenerative Diseases and their Therapies

The average age of current population is increasing¹. As aged population grows, the number of people with age-related neurodegenerative diseases is rising fast. Not only the health problems of individuals but also their decreasing quality of life and besetment of their family members are the consequences of a progressive community neurodegeneration.

Although, numerous potential drugs and therapeutic concepts have been developed to produce benefits in neurodegenerative disorders, currently *no specific cure is available neither to treat nor to stop a progression of the most common of these disorders* like Alzheimer's and Parkinson's disease and the class of diseases caused by expanding CAG repeats including Huntington's disease².

The greatest promise for treatment discovery of inherited disease is in the disease affecting single gene. It could be supposed that discovery of therapy for one of the neurodegenerative disorders will lead to uncovering the therapies for other diseases with neurodegenerative source.

Huntington's Disease

One of the few neurodegenerative diseases with a known genetic background is Huntington's disease (HD). The mutation responsible for this disorder is an abnormally extended expansion of polymorphic CAG (polyQ) repeat within the gene encoding the huntingtin protein³. Symptoms begin insidiously in the mid-life, but the age of onset can vary from early childhood. The disease is progressive and ends in death some 15 – 20 years after onset⁴.

Hunting for the Therapy

The process of drug development requires optimizing both for economic and for ethical reasons, in order to provide patients with appropriate treatments in a reasonable time frame. The pre-clinical tests are required for confirmation of their efficacy, safety, feasibility and desirability in treating of the diseases. Therefore the suitable animal model plays a pivotal role in this process.

Animal Models for Translational Research

Rodent models are the most widely used due to the possibility for genetic and environmental standardization, a broad spectrum of strains tailored to specific

scientific problems, and their acceptance by the regulatory authorities. However, rodent models do not satisfactorily parallel the brain changes and behavioral features observed in patients with neurodegenerative diseases^{5,6,7}. Large animal model could fulfill the wide gap in between rodents and humans. The longevity of large animal models (>10 years) and their analogous brain structure to humans make them especially suited to studying late-onset neurodegenerative disorders.

Pig as an Animal Model

At present, transgenic pigs are increasingly being established as large animal model for selected human diseases^{8,9}. Pigs are much closer to humans than mice in anatomy, complexity, physiological function, and genetics^{10,11}. The large size of the pig brain permits the detailed identification of cortical and subcortical structures by imaging techniques such as PET¹² or MRI^{13,14}. Thus development of animal models of human brain disorders in pigs can benefit from the full range of neuroscience techniques, as an alternative to research. Important are practical and ethical aspects of the use of pigs as an experimental animal. Pigs are in general breed as a human feed. Due to the widespread agricultural use of pigs, pig production systems or even systems for housing laboratory pigs are readily available. Finally, current knowledge of aspects of behavioral processes including learning and memory are reviewed¹⁵ and complete the summary of the status of pigs as a species suitable for experimental models of diverse human brain disorders.

Transgenic Libečkov Miniature Pig as a Model for HD

In our Laboratory, we have generated porcine model of HD. Lentiviral vectors encoding N-truncated (548aa) human huntingtin (htt) containing polyQ repetition under the control of human htt promoter were micro-injected into the porcine zygote. Genome analyses demonstrated the integration of transgene into the chromosome 1q24-q25 and the repetition of 124 glutamines in human htt. Assuming a presence of the two endogenous porcine htt alleles, we can announce that transgenic animals have integrated 1 insert of transgene in their genome. TR-FRET analysis of the F1 animals proved the active expression of human mutant htt in miniature pig's cortical tissue. Western blot confirmed the expression of htt protein in the tissues from

all three germ layers¹⁶. HD transgenic minipigs mature at the age of 5 months and they are able to produce F2 and F3 transgenic generations with the transgenics rate of approximately 50 % per birth.

Suitable Model for Translational Research

The generation of transgenic minipig is still not the mark of success, until the phenotype of animal model does not correspond to the symptoms of patients. Observing the same (or very similar) pathological and physiological changes in the model organism and human, similar effect of the tested drugs or other potential treatments could be expected.

As mentioned above, HD typically onsets in the middle age. But some changes can be remarked before the clinical symptoms are evident (manifest stage). For example activation of immune system¹⁷ is detected about 15 years before observation of chorea movements. This is so called pre-manifest stage. Our studies are focused on characterization of both of these stages in HD minipigs. Longitudinal studies are necessary due to the progressive character of HD. Therefore we repeat all of the analyses regularly in three months intervals.

Pre-manifest stage of HD

HD is considered to be the important disease, embodying many of the major themes in modern neuroscience, including molecular genetics, selective neuronal vulnerability, excitotoxicity, mitochondrial dysfunction, apoptosis and transcriptional dysregulation¹⁸. We therefore study for example the levels of cytokines in blood serum to map the activation of immune system. The level of DNA damage and mitochondrial dysfunction in transgenic and control cells is under investigation. Of course, we also follow the expression level of transgenic huntingtin and its influence on expression levels of other genes/proteins. As testicular degeneration^{19,20} is one the symptoms of HD, the quality of semen is examinant.

HD damages the basal ganglia²¹ – a specific area of the brain – but also involves other regions, primarily the cerebral cortex what results into brain atrophy. Within the striatum, the most sensitive cell population is the medium spiny neurons with the nuclear aggregates of mutant huntingtin protein¹⁸. Therefore MRI and MRS study completed with brain immune/histology is performed.

References:

1. <http://www.healthpromoting.com/Articles/articles/expect.htm>, downloaded June 24, 2012.
2. Lee ST, Kim M: *Mech Ageing Dev* 127, 432 (2006).
3. The Huntington's Disease Collaborative Research Group: *Cell* 72, 971 (1993).
4. Walker FO: *Lancet* 369 (9557), 218 (2007).
5. Ariano MA, Aronin N, et al: *J Neurosci Res* 68, 716 (2002).
6. Gil JM, Rego AC: *Brain Res Rev* 59, 410 (2009).
7. Van Raamsdonk JM, Pearson J, et al: *J Neurosci* 25, 4169 (2005).
8. Kurome M, Ueda H, et al: *Transgenic Res* 15, 229 (2006).
9. Nagashima H, Fujimura T, et al: *Theriogenology* 59 (1), 95 (2003).
10. Aigner B, Renner S, et al: *J Mol Med* 88, 653 (2010).
11. Vodicka P, Smetana K Jr, et al: The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann N Y Acad Sci* 1049, 161 (2005).

Manifest stage of HD

Motor impairment, cognitive deterioration and psychiatric disturbances are observed in manifest stage of HD^{4,21}. General intellectual abilities show a mild diffuse decline within the first years. More subtle early impairment may be observed regarding sustained attention, problem solving and verbal fluency along with memory declension. The most common clinical manifestation of HD is chorea. Movement difficulties are associated with both involuntary and voluntary movement, which progressively worsen over time. Battery of cognitive and motor tests was set to characterize this stage. Equipment used for HD patients based on objective (computer) evaluation of obtained data is used for this study.

Conclusion

As aged population grows, the number of people with age-related neurodegenerative diseases is rising fast. Unfortunately, no known therapy is available to treat these diseases. In the meantime, the list of compounds could be used in treatment of neurodegenerative disorders but suitable animal for pre-clinical tests is necessary to be generated. Although, small animal models animals of human diseases are highly informative they often do not faithfully mimic the human conditions. Moreover, it is unknown whether the magnitude of benefit in rodents predicts the magnitude of benefit in humans. Therefore the generation of an alternative animal model which could help in understanding of mechanisms of disease and provide the evaluation of efficacy and safety of new drugs or therapeutic concepts is critical for the success of translational research. Miniature pig seems to be suitable large animal model for simulating of neurodegenerative diseases. As the greatest promise for treatment discovery of inherited disease is in the disease which affects single gene, we have generated transgenic model of miniature pig with Huntington's Disease caused by the mutation in huntingtin gene. Our current effort is focused on characterization of both pre-manifest and manifest stages of HD. Phenotyping will allow the collection of longitudinal molecular data, to complement metabolic, behavioral and MRI assessments that will yield detailed information of the disease process over a decade or more and will provide information about possibilities of translational research.

12. Rosa-Neto P, Doudet DJ, Cumming P: *Neuroimage* 22, 1076 (2004).
13. Duhaime AC, Saykin AJ: *J Neurosurg* 104, 259 (2006).
14. Watanabe H, Andersen F: *Neuroimage* 14, 1089 (2001).
15. Gieling ET, Nordquist RE, van der Staay FJ: *Anim Cogn.* 14 (2), 151 (2011).
16. Baxa M, Juhas S, et al: *Clin Genet* 80, S1 14 (2011)
17. Björkqvist M, Wild EJ et al: *J Exp Med.* 205 (8), 1869 (2008).
18. Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E: *Physiol Rev.* 90 (3), 905 (2010).
19. Sathasivam K, Hobbs C, et al: *Hum Mol Genet* 8 (5), 813 (1999).
20. Dragatsis I, Levine MS, Zeitlin S: *Nat Genet* 26 (3), 300 (2000).
21. Pérez-De La Cruz V, Santamaría A: *Physiol Res* 56, 513 (2007).

Summary

Baxa M.: Transgenic Miniature Pig as a Model for the Study of Huntington's Disease

As aged population grows, the number of people with age-related neurodegenerative diseases is rising fast. Unfortunately, no known therapy is available to treat these diseases. The list of compounds could be used in treatment of neurodegenerative disorders but suitable animal model for pre-clinical tests is necessary to be generated. Although, small animal models of human diseases are highly informative they often do not faithfully mimic the human conditions. Miniature pig seems to be suitable large animal model for simulating of neurodegenerative diseases. We have generated transgenic miniature pig as a model of Huntington's Disease which is caused by the mutation in huntingtin gene. Our current effort is focused on characterization of both pre-manifest and manifest stages of HD. Phenotyping will allow the collection of longitudinal molecular data, to complement metabolic, behavioral and MRI assessments that will yield detailed information of the disease process over a decade or more and will provide information about possibilities of translational research.

Keywords: Transgenic pig, Huntington's Disease, Large animal model, Neurodegenerative disease

Souhrn

Baxa M.: Transgenní miniaturní prase jako model ke studiu Huntingtonovy choroby

S tím, jak se zvyšuje průměrný věk obyvatelstva, roste i počet lidí trpících neurodegenerativními onemocněními. Bohužel, dodnes nebyl nalezen žádný způsob terapie těchto chorob. Připraveno je mnoho produktů, které by mohly být použité k jejich léčení, avšak pro jejich verifikaci v pre-klinických testech je potřebný vhodný zvířecí model. Ačkolí malé zvířecí modely poskytují mnoho informací, často dostatečně nesimulují průběh nemoci u pacientů. Proto jsme vytvořili transgenní miniaturní prase jako model pro studium Huntingtonovy choroby, která je způsobena mutací v genu zvaném huntingtin. Naše snaha je zaměřena na charakterizaci její pre-klinického i klinického stádia. Dlouhodobé sledování fenotypu umožní získat potřebná data o průběhu choroby na molekulárně genetické, metabolické i behaviorální úrovni a poskytne informace o možnosti použití tohoto modelu pro testování potenciálních terapií neurodegenerativních onemocnění.

Klíčová slova: transgenní prase, Huntingtonova choroba, velké zvířecí modely, neurodegenerativní onemocnění

NANOPROTILÁTKY: NOVÉ IMUNOREAGENTY PRO VÝZKUM, DIAGNOSTIKU A TERAPII

Luděk Eyer a Milan Fránek

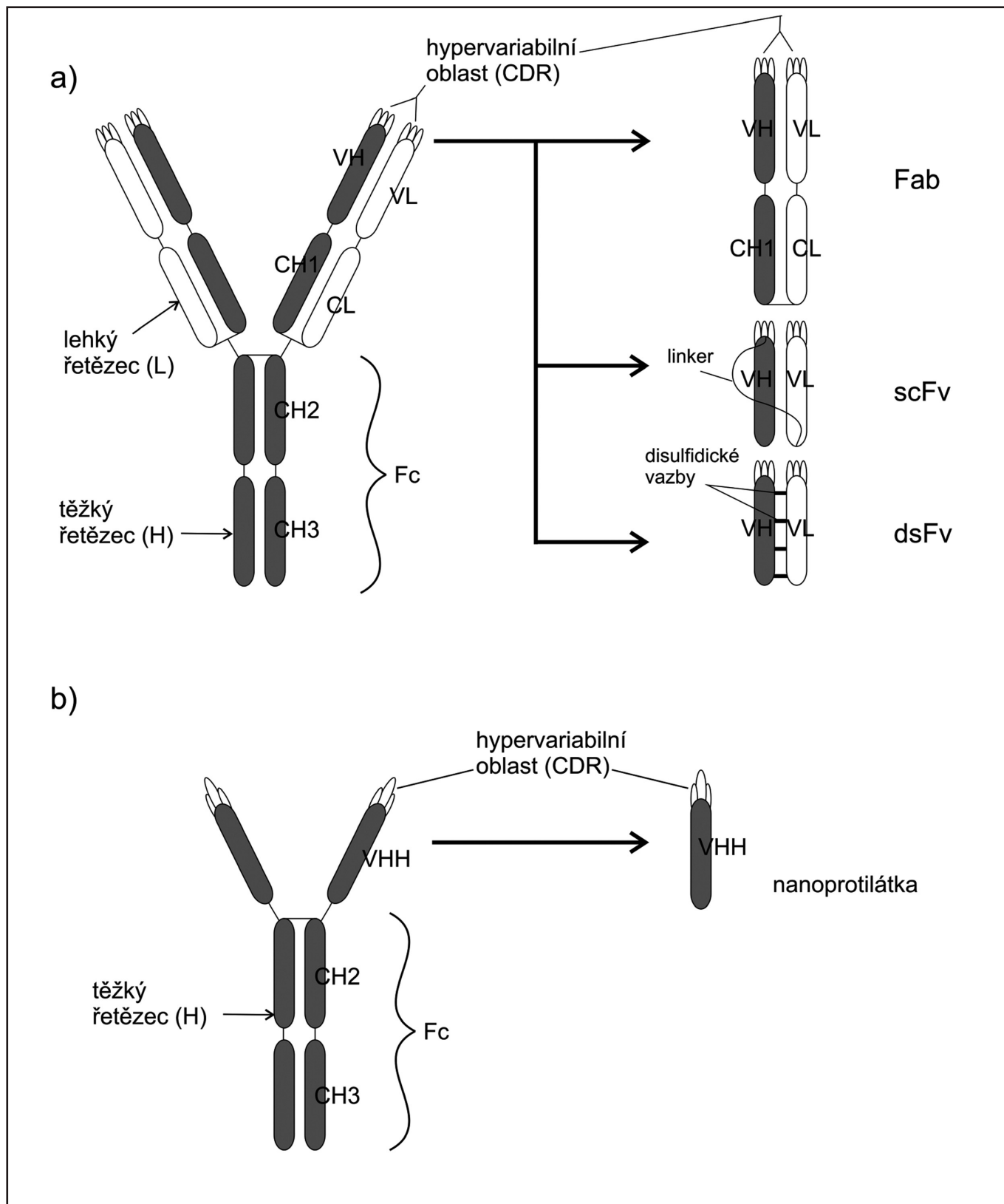
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, eyer@vri.cz

Co jsou to nanoprotilátky?

Začátkem devadesátých let 20. století bylo belgickými vědci publikováno překvapivé zjištění: B-lymfocyty savců z čeledi velbloudovití (*Camelidae*) a některých paryb (*Chondrichthyes*) produkují kromě konvenčních (klasických) humorálních protilátek rovněž protilátky s odlišnou strukturou. Na rozdíl od konvenčních protilátek, které jsou tvořeny dvěma identickými těžkými (H) a lehkými (L) řetězci, jsou tyto nově objevené protilátky složeny pouze ze dvou vzájemně spojených těžkých řetězců (obr. 1). Proto jsou v odborné literatuře označovány jako „heavy-chain antibodies“ (HCAbs), tj. protilátky tvořené těžkými řetězci. U lam a velbloudů postrádají tyto protilátky konstantní doménu CH1, která u konvenčních protilátek umožňuje

spojení těžkých řetězců s lehkými. Protože se lehké řetězce u HCAbs nevyskytují, jejich vazebné místo je součástí jediné variabilní domény těžkého řetězce, která nese u velbloudovitých savců označení VHH (variable domain of the heavy-chain antibody) a u paryb VNAR (variable domain of the shark new antigen receptor)¹.

Expresí genů kódujících VHH domény v bakteriích a kvasinkách byly získány monomerní rekombinantní fragmenty, tzv. nanoprotilátky. Nanoprotilátky lze definovat jako nejmenší funkční fragmenty protilátek, které specificky rozpoznávají antigen. V literatuře jsou označovány jako „nanobodies“, „nanoantibodies“ nebo „single domain antibodies“¹. Široce rozšířený termín „nanobodies“ zavedla belgická biofarmaceutická společnost



Obr. 1. Struktura protilátek

(a) Molekula konvenční protilátky (vlevo), rekombinantní fragmenty (vpravo); (b) protilátka tvořená těžkými řetězci (vlevo), nanoprotilátka (vpravo).

čnost Ablynx, která je jedním z předních producentů rekombinantních fragmentů odvozených z protilátek velbloudů a lam. Kromě vysoké afinity a specifity vůči antigenu a možnosti neomezené produkce vykazují nanoprotilátky zcela unikátní strukturní a funkční charakteristiky, díky kterým mohou v budoucnosti

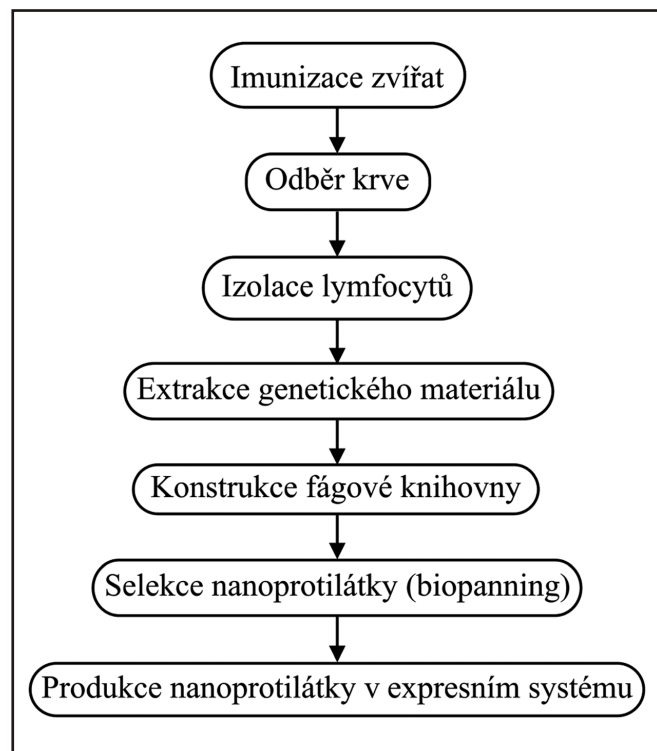
nalézt širší uplatnění ve výzkumu i v klinické praxi než dosud používané polyklonální a monoklonální protilátky či jiné rekombinantní fragmenty.

V minulém čísle Bioprospectu² popsali Daussant a Desvaux ve svém krátkém přehledu evoluční původ protilátek tvořených těžkými řetězci a základní

vlastnosti nanoprotilátek. Příspěvek uveřejněný v tomto čísle Bioprospectu si klade za cíl informovat čtenáře podrobněji o přípravě, strukturních aspektech a budoucím využití nanoprotilátek v medicíně a příbuzných oborech.

Příprava nanoprotilátek

Až do 70. let minulého století byla příprava protilátek založena pouze na imunizaci experimentálních zvířat. Pomocí této tradiční techniky však lze získat výhradně polyklonální protilátky. V roce 1975 byla popsána metoda pro přípravu monoklonálních protilátek, tzv. hybridomová technologie, která je založena na fúzi slezinných buněk (B-lymfocytů) produkujících protilátku s nádorovými buňkami s neomezeným proliferčním potenciálem. Vývoj moderních molekulárně-biologických metod pro klonování a expresi rekombinantní DNA v bakteriích a jiných organismech otevřel nové možnosti pro přípravu protilátkových fragmentů, mezi které patří i nanoprotilátky.



Obr. 2. Schéma přípravy nanoprotilátek s použitím rekombinantních technologií

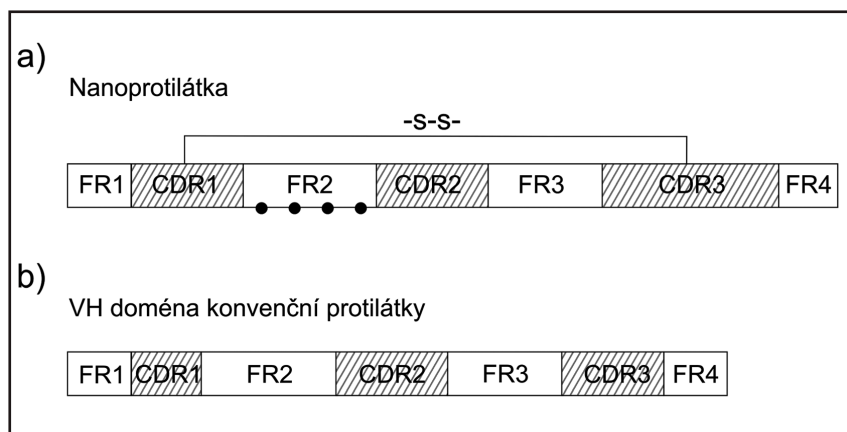
Příprava nanoprotilátek pomocí rekombinantních technologií je schematicky znázorněna na obr. 2. Tato metodologie je založena na konstrukci tzv. fágové knihovny, tj. populace fágových částic, do jejichž genomové DNA byl vložen gen kódující VHH doménu. Takové fágy pak vystavují molekuly nanoprotilátek na svém povrchu jako fúzní proteiny, což je označováno jako fágový display. Zdrojem genetického materiálu pro přípravu fágové knihovny jsou B-lymfocyty získané odběrem krve z imunizovaných lam nebo velbloudů. Geny kódující variabilní domény VHH jsou amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a následně klonovány do fágemidových expresních

vektorů. Klonovací strategie je v případě nanoprotilátek mnohem jednodušší než u jiných forem rekombinantních fragmentů vzhledem tomu, že VHH domény jsou kódovány pouze jediným genovým segmentem (exonem) o délce cca 450 párů bází. Expresí fágemidových genů v bakteriální buňce je získána fágová knihovna tvořená $10^6 - 10^7$ fágových částic. V případě nízké imunogenicity nebo toxicity imunogenu lze použít tzv. naivní fágové knihovny, jejichž příprava nevyžaduje imunizaci zvířat. Fágové nanoprotilátky s nejvyšší afinitou k antigenu jsou izolovány pomocí selekční technologie nazývané biopanning. Tato technologie je založena na několika cyklech po sobě následujících kroků: navázání fágových protilátek na imobilizovaný antigen, odstranění nenavázaných fágových protilátek a amplifikace získaných fágových klonů na hostitelském bakteriálním kmeni. Geny kódující nanoprotilátky s optimálními imunoanalytickými vlastnostmi jsou následně přeneseny do bakteriálních nebo kvasinkových buněk, které jsou využívány jako expresní systémy pro jejich finální produkci. V posledních letech byly nanoprotilátky úspěšně produkovány rovněž v savčích buňkách, geneticky modifikovaných rostlinách nebo houbách rodu *Aspergillus*, a to v koncentracích vyšších než $10 \text{ mg/L}^{3,4}$.

Struktura nanoprotilátek

Nanoprotilátky jsou řazeny mezi tzv. rekombinantní protilátkové fragmenty neboli rekombinantní protilátky. Společně s nanoprotilátkami patří do této skupiny rovněž tzv. scFv fragmenty (single-chain variable fragments) odvozené od konvenčních protilátek, které jsou však tvořené variabilními doménami jak lehkého tak těžkého řetězce spojenými krátkým polypeptidovým linkerem. Jinou formu rekombinantních protilátek představují disulfidicky stabilizované variabilní fragmenty (dsFv) a fragmenty označované jako Fab (obr. 1).

Nanoprotilátky jsou velmi malé rekombinantní protilátky o molekulové hmotnosti 12 – 15 kDa a rozměrech $4 \times 2,5 \text{ nm}$. Jsou složeny pouze z jediného polypeptidového řetězce o délce cca 120 aminokyselin, který představuje variabilní doménu protilátek tvořených těžkými řetězcí (VHH) (obr. 1). Nanoprotilátky jsou přibližně desetkrát menší ve srovnání s konvenčními protilátkami a poloviční vzhledem k ostatním rekombinantním fragmentům¹. Primární strukturou se nanoprotilátky podobají variabilním doménám těžkých řetězců (VH) konvenčních protilátek. To znamená, že jsou složeny ze čtyř konzervativních oblastí (framework regions, FR) s relativně stálou aminokyselinovou sekvencí a třech hypervariabilních oblastí (complementarity determining regions, CDR) s vysoce proměnlivou primární strukturou, které tvoří vazebné místo nanoprotilátky (obr. 3). Konformační stabilita vazebného místa nanoprotilátky je zajištěna několika disulfidovými vazbami, které vznikají mezi cysteinovými zbytky na hypervariabilních úsecích CDR1 a CDR3. Konzervativní oblast FR2 je charakteristická



Obr. 3. Strukturní rozdíly mezi nanoprotílátkou a VH do-ménou konvenční protílátky

FR1-FR4 představují konzervativní úseky, CDR1-CDR3 představují hypervariabilní úseky, plné kroužky vyznačují hydro-filní aminokyseliny.

vyšším zastoupením hydrofilních aminokyselin, které udílejí nanoprotílátkám dobrou rozpustnost ve vodném prostředí⁴.

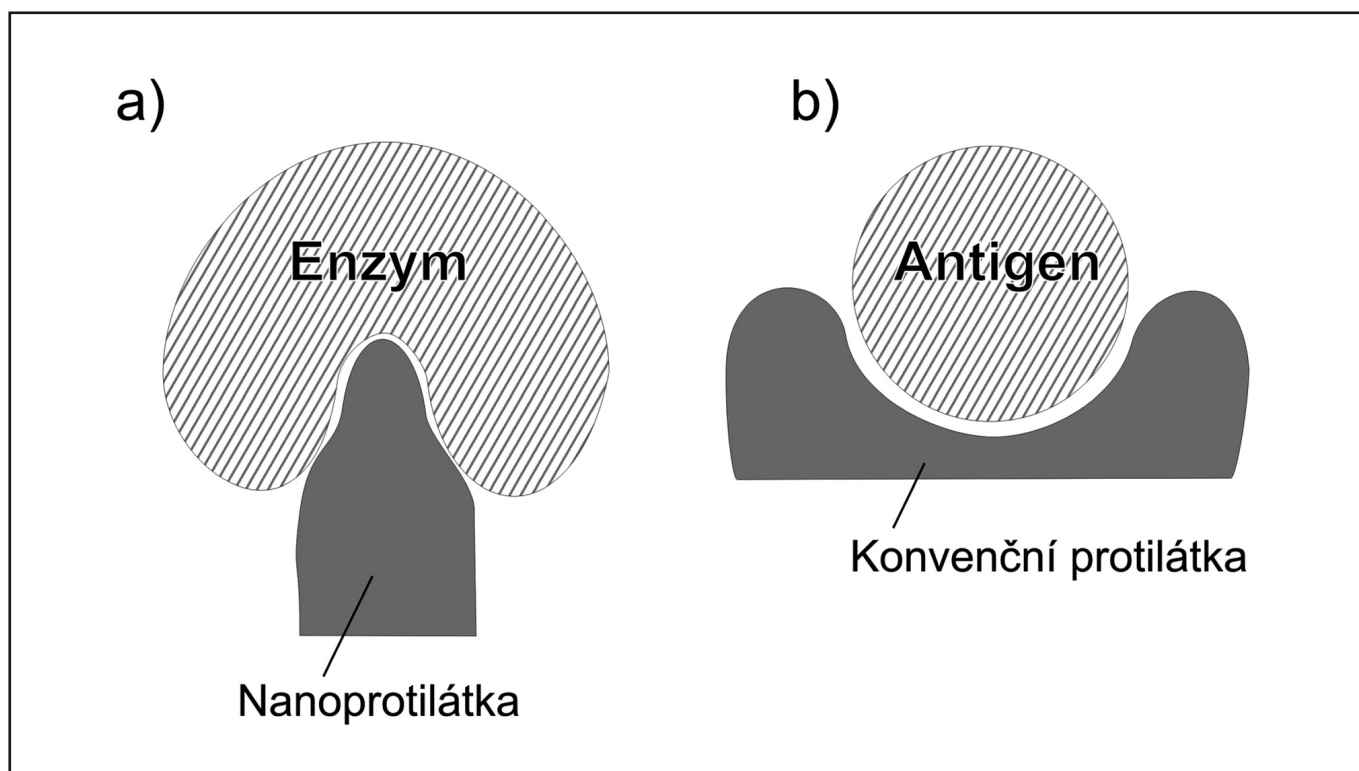
Zatímco vazebné místo konvenčních protílátek je tvořeno šesti hypervariabilními úseky, vazebné místo nanoprotílátek je vzhledem k nepřítomnosti lehkých řetězců utvářeno pouze třemi hypervariabilními úseky. Z krystalografických studií komplexů nanoprotílátka-antigen je zřejmé, že hypervariabilní úseky CDR1 a CDR2 mají při rozpoznávání antigenu pouze omezený význam. Naopak, značně prodloužený úsek CDR3 hraje při vazbě antigenu klíčovou roli a podílí se z 60 – 80 % na interakci vazebného místa nanoprotílátky s antigenem. Tento hypervariabilní úsek je tvo-

řen dlouhou polypeptidovou smyčkou podobnou prstu, takže vazebné místo nanoprotílátky má vypuklý (konvexní) tvar. Tím se zásadně liší od konvenční protílátky, u které je vazebné místo tvořeno štěrbinou nebo dutinou, do níž se zasouvá antigen podobně jako klíč do zámku (obr. 4). Vzhledem k charakteru vazebného místa rozpoznávají nanoprotílátky i tzv. kryptické epitopy, které se nacházejí v dutinách na povrchu proteinů nebo v záhybech buněčné membrány či virového obalu a jsou pro konvenční protílátky prostorově (stéricky) obtížně přístupné. Nanoprotílátky mohou proto interagovat s katalytickým místem enzymů nebo vazebným místem buněčných receptorů a působit jako jejich inhibitory^{3,5}.

Kromě nanoprotílátek vázajících kryptické epitopy byly popsány i takové nanoprotílátky, které rozpoznávají běžné proteinové a peptidové antigeny včetně haptenu⁶.

Vlastnosti nanoprotílátek

Dosud byly popsány desítky nanoprotílátek, které rozpoznávají antigenní determinanty enzymů, patogenních organismů a parazitů, toxinů a nádorových markerů s extrémně vysokou specifitou a afinitou ($k_d < 1 \text{ nM}$)⁶. Nanoprotílátky jsou stejně jako ostatní rekombinantní fragmenty monovalentní tzn., že nesou



Obr. 4. Vazebná interakce nanoprotílátky a konvenční protílátky s antigenem

Vypuklý (konvexní) tvar vazebného místa nanoprotílátky umožňuje vazebnou interakci s aktivním místem enzymu nebo buněčného receptoru (a). V případě konvenční protílátky se antigen váže do vazebného místa ve tvaru dutiny (b).

jedno vazebné místo vůči jedinému epitopu. Díky jednoduché struktuře však mohou vytvářet multivalentní a multispecifické konstrukty se schopností vázat současně různé antigeny nebo rozpoznávat odlišné epitopy téhož antigenu³.

Jednoduchá monomerní struktura uděluje nanoproti-látkám značnou odolnost vůči vysokým teplotám. Ačkoli nanoproti-látky denaturují při 60 – 80 °C, při opětovném snížení teploty zcela obnovují svoji původní strukturu. Tím se liší od konvenčních protilátek, které podléhají při uvedených teplotách nevratným strukturním změnám. Nanoproti-látky zůstávají biologicky aktivní rovněž v prostředí o nízkém pH, v přítomnosti proteáz a detergentů i při extrémně vysokém tlaku³. Vyšší obsah hydrofilních aminokyselin vede k dobré rozpustnosti nanoprotilátek ve vodném prostředí a k omezené schopnosti tvořit agregáty. Tímto se výrazně liší od ostatních rekombinantních fragmentů, zejména od scFv, jež jsou ve vodě často obtížně rozpustné a během exprese uvnitř bakteriální buňky spontánně tvoří inkluzní tělíska, což snižuje výtěžek rekombinantního produktu^{1,4}.

Malá velikost molekuly umožňuje nanoproti-látkám snadno penetrovat do tkání a mezibuněčných prostor. Nanoproti-látky jsou schopny překonat i tzv. hematocefalickou bariéru mezi krví a centrální nervovou soustavou³. V lidském organismu vykazují nanoproti-látky nízkou imunogenicitu, která je dána nejen malými rozměry jejich molekuly, nýbrž i vysokým stupněm sekvenční homologie (až 90 %) s lidskými VH doménami. Imunogenicitu nanoprotilátek je možno dále snižovat tvorbou tzv. humanizovaných nanoprotilátek, tj. náhradou aminokyselinových sekvencí, které vykazují nižší homologii s lidskými protilátkami, za úseky s vyšším stupněm homologie, aniž by došlo k ztrátě jejich afinity či specifity⁴.

Využití nanoprotilátek v imunoanalytických a diagnostických metodách

Molekulární charakteristiky nanoprotilátek a relativně nízké náklady spojené s jejich produkcí značně rozšiřují možnosti aplikace těchto rekombinantních fragmentů v diagnostice a imunoanalytických technikách. Nanoproti-látky mohou být využity zejména pro vývoj nových, vysoce citlivých ELISA testů a imunosenzorů, kde mohou nahradit tradičně používané protilátkové reagenty. Jejich malé rozměry, monomerní charakter a snížená schopnost agregace umožňují imobilizovat extrémně vysoký počet molekul nanoprotilátek na povrch jamky mikrotitrační destičky nebo biočipu, což vede ke zvýšení citlivosti imunodetekčního systému. Imobilizace nanoprotilátky na pevný povrch může být usnadněna jejich konjugací s Fc fragmentem nebo fúzí s proteiny vázajícími celulózu nebo chitin. Jako příklad detekčních systémů na bázi nanoprotilátek lze uvést ELISA testy pro určení tzv. druhově specifických antigenů, tj. antigenů, jimiž se liší jednotlivé druhy patřící to téhož rodu. Takové ELISA testy jsou v současnosti využívány např. pro rozlišení jednotlivých druhů tasemnic či parazitů rodu *Trypanosoma*⁷.

Nanoproti-látky mohou být s výhodou využívány rovněž v imunoafinitní chromatografii. Vysoce stabilní nanoproti-látky jsou odolné vůči působení organických rozpouštědel využívaných pro eluci zachycených ligandů a pro regeneraci imunoafinitních kolon. Imunosorbenty s navázanými nanoproti-látkami mohou být opakovaně použity až 2000krát, aniž by došlo ke snížení jejich vazebné kapacity. Vysoká hustota molekul nanoprotilátek imobilizovaných na částicích imunosorbentu navíc významně zvyšuje účinnost imunoseparačního procesu. Na druhé straně, pro izolaci některých nestabilních proteinů z krevního séra, např. α -1-antitrypsinu a srážlivého faktoru VIII, byly připraveny nanoproti-látky, které umožňují eluci molekul ligandu za použití velmi šetrných elučních podmínek^{6,7}.

Efektivní penetrace do tkání a schopnost překonat hematocefalickou bariéru činí z nanoprotilátek perspektivní kandidáty pro konstrukci zobrazovacích sond využívaných pro monitorování nádorů a metastatických lézí *in vivo*. V této oblasti nacházejí uplatnění radioaktivně a fluorescenčně značené nanoproti-látky⁷.

Terapeutické využití nanoprotilátek

Stejně jako monoklonální a rekombinantní protilátky nabízejí i nanoproti-látky široké uplatnění v terapii závažných onemocnění u lidí. Nanoproti-látky mohou rozpoznávat a účinně inaktivovat široký repertoár patogenních organismů, blokovat proliferaci nádorových buněk a ovlivňovat rozličné buněčné procesy, jako transkripci DNA a buněčnou nekrózu či apoptózu. Nanoproti-látky konjugované s enzymy, antibiotiky a cytostatiky mohou být využity pro specifický transport léčiva do místa infekce či k nádorovým buňkám, aniž by měly škodlivý vliv na zdravou tkáň.

Díky jedinečným vlastnostem je možné využívat nanoproti-látky i tam, kde konvenční protilátky nelze uplatnit. Vzpomeňme např. na jejich schopnost vázat se do aktivního místa enzymů, která otevírá nové možnosti terapeutického využití nanoprotilátek jako enzymových inhibitorů. V důsledku vysoké afinity a specifity nanoprotilátek vůči vnitřnímu povrchu aktivního místa enzymu, představují nanoproti-látky mnohem účinnější enzymové inhibitory než dosud používaná chemická léčiva. Inhibitory enzymů na bázi nanoprotilátek byly použity k potlačení růstu mnoha patogenních mikroorganismů i k inhibici proteolytické aktivity bakteriálních i živočišných toxinů *in vivo*³.

Vzhledem k značné odolnosti k nízkým hodnotám pH i k působení proteáz si nanoproti-látky zachovávají biologickou aktivitu uvnitř trávicího traktu. Preparáty obsahující nanoproti-látky mohou být pacientům podávány orálně, čehož lze efektivně využívat při léčbě závažných gastrointestinálních onemocnění, včetně virové gastroenteritidy nebo Crohnovy choroby³.

Zcela inovativní přístupy ve vývoji a aplikaci terapeutických nanoprotilátek nabízejí technologie genetického inženýrství a genová terapie. Velmi perspektivním se jeví vývoj intracelulárních protilátek, tzv. „intrabodies“, což jsou nanoproti-látky exprimované uvnitř buněk,

kteře inaktivují různé intracelulární proteiny, např. transkripční faktory zodpovídající za vznik a růst nádorů. Zajímavým přístupem je rovněž aplikace transgenních bakterií, které produkují funkční nanoprotílátku přímo v místě infekce. Uvedené technologie jsou v současné době intenzivně studovány na tkáňových kulturách a myších modelech⁶.

Belgická společnost Ablynx připravila řadu terapeutických nanoprotílátek s cílem přispět k léčbě trombózy, revmatoidní artritidy, Alzheimerovy choroby a četných nádorových onemocnění. Některé z vyvíjených preparátů se v současné době nacházejí ve stádiu preklinických testů na zvířecích modelech nebo *in vitro*, jiné již pokročily do I. či II. fáze klinických zkoušek na dobrovolnících. Neméně významným producentem nanoprotílátek pro terapeutické a výzkumné účely je NRC, Institute for Biological Science v Kanadě. Výzkumem nanoprotílátek se zabývá rovněž oddělení entomologie na kalifornské univerzitě v Davisu. Během studijního pobytu na tomto pracovišti se jeden z autorů tohoto odborného příspěvku (L. E.) blíže seznámil

s problematikou nanoprotílátek a podílel se na vývoji a zavedení technologie fágový display.

Závěr

Nanoprotílátky představují novou generaci imunorea-gentů a terapeutických prostředků, které nabízejí široké možnosti využití v analytických a diagnostických metodách a mohou rovněž nahrazovat tradiční terapeutika v léčbě závažných chorob u lidí. To je umožněno jejich jedinečnými vlastnostmi, jako je malá velikost molekuly, vysoká fyzikálně chemická stabilita, dobrá rozpustnost ve vodném prostředí a schopnost rozpoznávat antigeny, které jsou pro konvenční protílátky nedostupné. Nanoprotílátky mohou proto nalézt četná uplatnění jako účinné imunoafinitní komponenty, imunoanalytické reagenty, inhibitory enzymů nebo intracelulární protílátky. Výsledky nejnovějších preklinických studií i klinických testů ukazují, že v nedaleké budoucnosti budou nanoprotílátky významně konkurovat dosud používaným monoklonálním protílátkám a existujícím rekombinantním fragmentům.

Tato práce vznikla v rámci řešení projektu AdmireVet č. CZ.1.05/2.1.00/01.0006-ED00060101 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a grantu č. MZE0002716202 Ministerstva zemědělství České republiky.

Literatura

1. Tillib, S. V.: Mol. Biol. 45, 1 (2011).
2. Daussant, J., Desvaux, F. X.: Bioprospect. 21, 1 (2012).
3. Van Bockstaele, F., Holz, J-F., Revets, H.: Curr. Opin. Invest. Dr. 10, 11 (2009).
4. Deffar, K., Shi, H. et al.: Afr. J. Biotechnol. 8, 12 (2009).
5. Muyldermans, S., Baral, T.N. et al.: Vet. Immunol. Immunop. 128, 1 (2009).
6. De Marco, A.: Microb. Cell. Fact.: 10, 44 (2011).
7. Huang, L., Muyldermans, S., Saerens, D.: Expert Rev. Mol. Diagn. 10, 6 (2010).

Souhrn

Eyer L., Fránek M.: Nanoprotílátky: nové imunoreagenty pro výzkum, diagnostiku a terapii

Nanoprotílátky jsou rekombinantní fragmenty odvozené z protílátek tvořených těžkými řetězci, které se vyskytují v krevním séru a tkáních savců čeledi *Camelidae*. Nanoprotílátky se liší od konvenčních protílátek i jiných rekombinantních fragmentů řadou jedinečných vlastností, jako je malá velikost molekuly, dobrá rozpustnost ve vodném prostředí a konformační stabilita při vysokých teplotách i při nízkých hodnotách pH. Vypuklý (konvexní) tvar vazebného místa umožňuje nanoprotílátkám rozpoznávat epitopy, které jsou lokalizovány v dutinách proteinů nebo záhybech virových obalů a buněčných membrán. Díky uvedeným vlastnostem mohou být nanoprotílátky v budoucnosti využívány jako účinná terapeutika i jako reagenty v imunoanalytických a diagnostických metodách.

Klíčová slova: nanoprotílátka, rekombinantní fragment, antigen, vazebné místo, fágová knihovna

Summary

Eyer L., Fránek M.: Nanobodies: new immunoreagents for research, diagnostics and therapy.

Nanobodies are recombinant fragments derived from heavy-chain antibodies which occur in blood serum and tissues of camelids. Nanobodies differ from conventional antibodies and other recombinant fragments in numerous unique properties, such as a small molecular size, good water solubility and conformational stability at high temperatures, as well as at low pH values. The convex shape of binding sites of nanobodies enables them to recognize epitopes which are buried in protein cavities or clefts of viral envelopes and cell membranes. Due to their properties, nanobodies could be in the future applied as effective therapeutics and also as reagents in immunoanalytical and diagnostic methods.

Keywords: nanobody, recombinant fragment, antigen, binding site, phage library

BIOTECHNOLOGICKÉ SYSTÉMY PRO JEDNORÁZOVÉ POUŽITÍ

Petr Hošek

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, petr.hosek@vscht.cz

Úvod

Zatímco nerezové reaktory a příslušenství se v biotechnologických výroбах používají mnoho let, jednorázové systémy se do výroby zavádějí teprve poslední dobou. Z počátku byly jednorázové plastové kontejnery používány pouze na skladování a míchání pufrů a médií. Později se začaly používat i jednorázové reaktory, pouze však na přípravu inokula, neboť ještě neměly potřebnou produkční kapacitu, kterou disponovaly nerezové produkční fermentory. V nynější době lze z jednorázových komponent sestavit celou biotechnologickou linku včetně středně velkého jednorázového bioreaktoru a navazující down-stream části (puriﬁkací, formulací, ...) ^{1,2}.

Proč jednorázové komponenty?

Jednorázové systémy se začaly objevovat jako reakce na potřebu stále snižovat cenu vyráběných produktů, na potřebu vyrábět stále větší počet různých látek a na potřebu omezit ušlý zisk způsobený kontaminací². Zejména třetí vyjmenovaný důvod předurčuje použití jednorázových systémů v produkcích protilátek či jiných proteinů živočišnými buňkami. Při fermentacích za použití bakterií či případně kvasinek není nebezpečí zničení vsádky díky kontaminaci příliš vysoké, zatímco u živočišných buněk i velmi nízký počet kontaminujících bakterií může díky značně vyšší rychlosti dělení vsádku znehodnotit. Při využití předsterilizovaných jednorázových komponent je toto nebezpečí značně



Obr. 1 – Jeden z největších výkyných reaktorů o objemu 500 litrů⁴

sníženo, zejména díky vyšší účinnosti gamma sterilizace nad sterilizací vodní parou.

Další výhodou jednorázových systémů je omezení operativních časů na přípravu dalšího produkčního cyklu, neboť odpadá nutnost provádět čištění reaktoru a jeho sterilizaci. Médium přijde do styku pouze s jednorázovými plastovými pláště, které jsou po daném cyklu vyměněny za nové, předsterilizované. Výměna pláště je výrazně kratší než čištění a sterilace nerezových reaktorů a dalších nádob. Značnou úsporu času zajistí i použití jednorázových předkalibrovaných senzorů, kdy odpadá i potřeba validace.

Výměna veškerých ploch smočených médiem s sebou nese i možnost operativně přecházet na produkce jiných látek bez nebezpečí křížové kontaminace. Tato vlastnost jednorázových systémů je neocenitelná při výzkumu či produkci léčiv v druhé či třetí fázi klinických testů, kdy je potřeba vyrábět malé množství velkého počtu potenciálních léčiv.

Jednorázové reaktory

V průběhu poslední dekády se objevilo na trhu hned několik různých typů fermentačních reaktorů. Podle vzhledu je můžeme rozdělit do dvou velkých skupin a to na výkyvné reaktory a tankové reaktory. Výkyvný reaktor, uveden do prodeje už v roce 1999⁴, je plas-

tový obal naplněný médiem umístěný na plošinu, která vykonává kývavý pohyb. Tímto pohybem se v médiu generují vlny zajišťující důkladné promíchávání a aeraci kultivovaných buněk. Přestože probíhá aerace pouze z hladiny, v reaktoru lze dosáhnout koncentrace živých buněk až 8 mil. buněk na mililitr. Do prodeje byly nejdříve uvedeny maloobjemové reaktory (desetilitrové), větší reaktory bylo možno uvést až po vyřešení konstrukčních problémů. Bylo potřeba navrhnout vhodný zdroj pohonu (kývavý pohyb je náročný na převodovku) a zlepšit kvalitu pláště (docházelo často k prtržení). Nyní jsou tyto reaktory konstruovány pro objemy od 100 ml až po 500 litrů (obr. 1). Hlavním výrobcem výkyvných reaktorů je firma GE Healthcare.

Tankové reaktory svým tvarem napodobují běžně používané nerezové reaktory – jsou to cylindrické nádoby s uprostřed umístěným míchadlem⁵. Kontaktní povrch s médiem tvoří plastový plášť zvenku vyztužený nerezovou stěnou, ve které je uložena termoregulace reaktoru. Kvůli sterilizaci pláště dodavatelem bylo nutné uzpůsobit konstrukci míchadla a senzorů tak, aby nebyla při instalaci narušena sterilita. Takže míchadlo a rukáv na hřídel, které míchadlem otáčí, jsou již od výrobce zataveny do vyměnitelného pláště. Oproti výkyvnému reaktoru můžou mít tankové reaktory objem mnohem vyšší, běžně se produkují 2000 l reak-



Obr. 2 – Porovnání způsobu zapojení autoklavovatelného detektoru (vlevo) a detektoru s nástavcem (vpravo). Autoklavovatelný detektor je připojen pomocí Kleenpak konektoru¹⁰.

tory⁶, a díky své podobnosti s nerezovými tankovými reaktory lze na ně použít podobné scale-up postupy⁷. Tankové reaktory vyrábí celá řada firem jako Xcellerex, Sartorius Stedim Biotech, Thermo Fisher Hyclone.

V průběhu času se začaly objevovat i mírně odlišné konstrukce reaktorů. Příkladem je bioreaktor firmy New Brunswick Scientific, která místo tenkého plastového filmu podepřeného ocelovou stěnou používá jako plášť reaktoru silnostěnný plast⁸. Tím je zamezeno případné protrhnutí pláště reaktoru. Zajímavý koncept reaktoru představila firma PBS biotech, která pro míchání používá míchadlo poháněné pouze stoupajícími bublinami vzduchu. Díky tomu není potřeba motor na pohánění míchadla, a přesto je dosaženo výborného promíchávání⁹.

Jednorázové detektory

Každý biotechnologický proces potřebuje monitorovat určité parametry pro optimální produkci. Mezi tyto parametry v případě bioreaktoru patří bezesporu pH, teplota a koncentrace kyslíku. V klasickém procesu využívající nerezové tanky jsou potřeba detektory schopné vydržet sterilizaci parou. Po sterilizaci je běžně nutné provést kalibraci detektorů, což výrazně prodlužuje dobu, kdy je reaktor odstaven a neprodukuje. Pro jednorázové systémy existují dva odlišné přístupy zavedení detektorů do reaktoru. První, starší, využívá obvyklé autoklavovatelné detektory¹⁰. Na detektor se připevní jedna polovina speciálního konektoru a po autoklavování se připojí do druhé poloviny konektoru, který je součástí pláště reaktoru, čímž se detektor dostane do kontaktu s médiem bez porušení sterility zajištěné gamma sterilizací. Odlišný přístup je izolovat od sebe detektor a médium. Tím pádem není nutné detektor autoklavovat a ani často rekalibrovávat. Pro tento typ detektorů se do plášťů reaktoru už při výrobě zabudovávají speciální nástavce¹⁰. Protože plášť bioreaktoru není nikde proražen z důvodu vsunutí detektoru, sterilita prostředí není ohrožena, navíc je příprava reaktoru na další produkční cyklus velmi zkrácena o dobu potřebnou na sterilizaci detektorů a jejich kalibraci (obr. 2). Třetím přístupem je vytvořit jednorázový detektor již napevno zabudovaný do pláště reaktoru. Tyto detektory přicházejí už překalibrované, tím je zajištěna značná úspora času⁷.

Jednorázové příslušenství

Výrobní proces se neskládá pouze z reaktoru, ale i z přípravy médií, inokulace, purifikace a mnoha dalších kroků. Zavádění jednorázových systémů do těchto okrajových aplikací bylo průmyslem mnohem přijatelnější a vedlo tak k vytvoření hybridních výrob, kde se jednorázové komponenty vyskytovaly vedle nerezových (zejména reaktorů). Tyto systémy spojují výhody jednorázových systémů s velkou kapacitou nerezových reaktorů (např. 20 000 l).

Jednorázové míchače média a pufrů jsou většinou pravoúhlé či cylindrické nádoby z plastu či oceli, v nichž je podobně jako u reaktorů tenký plastový plášť

se zataveným míchadlem a porty pro vstup a výstup. Nejběžnější velikost míchače je 200 l, ale jsou k dostání i míchače na 10 000 l pufru či média¹.

Pro down-stream procesy je k dostání hned několik typů filtrů, a to například pro sterilizaci vzduchu, oddělení buněk či klarifikaci média. Lze používat jak membránovou tak hloubkovou filtraci v jednorázovém provedení.

Zcela nezbytnou součástí výrobního zařízení jsou nejrozličnější trubky a ventily. Zde stál před konstruktéry obtížný problém, jak zajistit sterilitu spojení dvou jednorázových konektorů. Jako každá jednorázová část výrobního procesu, i konektory se totiž sterilují gamma zářením při výrobě, a proto spojení konektorů musí proběhnout bez narušení sterility. Dodatečná sterilizace parou není možná (některé jednorázové komponenty teplotu nemusejí vydržet) a sterilizace gamma zářením on site je nemyslitelná (příliš velké investiční náklady). Pionýrem v této oblasti sterilitních konektorů byla firma Pall Corporation se svým konektorem Kleenpak. Do současné doby se na trhu objevilo pět dalších typů konektorů od ostatních výrobců. Díky novým designům se podařilo vyřešit i další výzvy pro jednorázové konektory, například možnost sterilitního rozpojení (tato schopnost nebývala samozřejmostí) a možnost napojení jednorázových komponent na komponenty nerezové. Zde byl navrhnout konektor, který umožňuje sterilizaci vodní parou a zároveň připojení gamma sterilizovaných součástí. Největším problémem v nynější době v oblasti konektorů je fakt, že každý výrobce vyrábí vlastní řadu konektorů, které jsou mezi sebou nekompatibilní. Tím je omezeno použití jednorázových komponent od více výrobců v jednom procesu, neboť konektory jsou již součástí jednorázových plášťů do reaktorů či míchačů médií. Řešení tohoto problému je v současné době věnováno velké úsilí^{11,12}.

Výluhy

Otázka výluhů, to je jedna z důležitých otázek, které uživatele jednorázových systémů trápí¹³. U nerezových komponent se tento problém nevyskytuje, ale v případě jednorázových komponent, kde do kontaktu s médiem přichází plast obsahující celou řadu aditiv, nabývá na významu. Problém je závažnější zejména díky vyměňování plastového pláště po každém výrobním cyklu, a tak každý nový cyklus začíná s původním obsahem vyluhovatelných látek v plášti. Vyluhované látky mohou mít nežádoucí efekty v produktu, zejména je-li produktem biolécivo. Proto je snahou výrobců jednorázových komponent tyto výluhy minimalizovat. Vzhledem k závažnosti problému jsou výluhy pečlivě monitorovány a každá jednorázová součástka má v průvodním listě množství výluhů zaznamenáno. Výluhy se pro tyto účely rozlišují na dva typy – extrahovatelné a vyluhovatelné látky. Extrahovatelné látky jsou látky, které se z materiálu můžou uvolit, a to například organickými solventy, vysokou teplotou či za jiných extrémních podmínek. Na druhou stranu se vyluhovatelné látky do média uvolňují už při provozních podmínkách, takže se skutečně dostávají do produktu. Je na posouzení provozovatele, jestli úroveň výluhů pro dané využití produktu není nadlimitní.

Závěr

Jednorázové komponenty jsou bezesporu novým trendem v biotechnologických produkcích. Původní nedůvěra v zavádění postupně opadá, jak je přinášeno stále více důkazů o ekonomické výhodnosti jednorázových systémů¹⁴. Mnohé problémy, se kterými se jednorázové komponenty potýkaly a bránily většímu rozšíření, jsou nyní uspokojivě vyřešeny. Lze tedy očekávat, že stále větší procento producentů bude na jednorázové systémy přecházet.

Literatura

1. Review of single use technologies in biomanufacturing <http://www.wpi.edu/Images/CMS/BEI/parrishgallier.pdf>, staženo 23. 1. 2012
2. Whitford, W.G.: *BioProcess International* 8(11), 34 (2010).
3. <http://fabad.org/fabad.org/pdf/volum34/issue1/43-53.pdf>, staženo 23.1.2012
4. [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/E1614193D5438786C1257628001D5AB9/\\$file/28950270AA.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/E1614193D5438786C1257628001D5AB9/$file/28950270AA.pdf)
5. <http://www.xcellerex.com/pdf/XDR-datasheet.pdf>
6. Whitford, B.: *European Biopharmaceutical Review* 146, (2011).
7. Single-Use Solutions for Scale-Up and Technology Transfer <http://finesse.com/files/pdfs/IPTOnline.pdf>, staženo 23. 1. 2012
8. Gossain, V., Mirro, R., Emerson, E.J., Kedzierski, S.: *Genetic engineering and biotechnology news* 30, 9 (2010).
9. http://pbsbiotech.com/wp-content/uploads/2011/05/PBSMicrocarrier_poster_Final_3x4_web.pdf, staženo 23. 1. 2012
10. Single-use Sensors for Upstream Applications <http://finesse.com/files/pdfs/Single-useSensors4Upstream.pdf>, staženo 23. 1. 2012
11. Focus on Standardization, Quality by Design, and Regulatory GMP <http://www.biopharminternational.com/biopharm/article/articleDetail.jsp?id=746282>, staženo 23. 1. 2012
12. Martin, J.: Standardization of single-use. Pros, Cons and possibilities. IBC Single Use Conference, Boston, MA, June 6 – 8, 2011
13. Extractables and leachables in pharma – A serious issue. http://www.solvias.com/sites/default/files/solvias_whitepaper_web.pdf, staženo 23. 1. 2012
14. Economic Comparison Between Stainless Steel and Single-Use Systems http://www.ibclifesciences.com/upload/wysiwyg/biopharma_series/B11187/presentations/Johnson_Jeff.pdf, staženo 23. 1. 2012

Souhrn

Hošek P.: Biotechnologické systémy pro jednorázové použití

Jednorázové systémy se v poslední době stále častěji využívají v průmyslu, kde donedávna dominovaly pouze nerezové bioreaktory a příslušenství. Oproti nerezovým systémům umožňují zvýšit počet produkčních cyklů za rok díky zkrácení čistění, výrazně snížit riziko kontaminace a kross-kontaminace při přechodu na jiný produkt a téměř na polovinu snížit potřebné investiční náklady. Díky postupujícímu vývoji jednorázových systémů je již nyní možné postavit celou produkční linku z jednorázových komponent.

Klíčová slova: jednorázové systémy, bioreaktory,

Summary

Hošek P.: Single-use biotechnological systems

Single-use systems have been recently increasingly used in industry which was dominated by stainless steel bioreactors and accessories. They manage to increase the number of production cycles per year through reduced cleaning, significantly reduce the risk of contamination and cross-contamination when switching to another product, and almost halve the required investment costs. The progressive development of single-use systems makes now possible to build a production line from single-use components only.

Keywords: Single-use systems, disposable, bioreactors

RACIONÁLNÍ NÁVRH MUTACÍ ZVYŠUJÍCÍ AFINITU VAZBY MEZI PROTEINY.

PŘÍPADOVÁ STUDIE PRO RECEPTOR 1 INTERFERONU- γ

Pavel Mikulecký, Jiří Černý, Lada Biedermannová, Hana Petroková, Milan Kuchař, Petr Malý, Jiří Vondrášek, Peter Šebo a Bohdan Schneider

Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, bohdan@img.cas.cz,

<http://www.structbio.eu/BS>

Úvod

Mezimolekulární rozpoznávání je možné definovat jako specifické interakce během nichž se vytváří relativně stálý komplex dvou nebo více molekul. Vzájemné rozpoznávání proteinů je podmínkou pro správné fungování všech biologických systémů. Na rozpoznávání proteinů závisí mimo jiné fungování řady signálních drah, včetně drah imunitní odpovědi. Ty tvoří velmi důležitou stránku fungování zejména vyšších eukaryotických organismů. Proteiny imunitního systému signalizují napadení organismu vnějšími agens právě prostřednictvím tvorby specifických komplexů mezi dvěma nebo více proteiny, vytvořený komplex přenáší informaci o vzniklém nebezpečí na další členy signální dráhy. Pro naše studium specifických interakcí molekul imunitního systému jsme zvolili interferon- γ (IFN- γ) a jeho receptor typu 1 (IFN- γ -R1). IFN- γ je důležitou součástí vrozeného imunitního systému obratlovců, imunitní reakce se spíná jeho interakcí s IFN- γ -R1 ukotveným v buněčné membráně. Tvorba komplexu IFN- γ /IFN- γ -R1 indukuje vazbu interferonového receptoru druhého typu, IFN- γ -R2 a takto vytvořený ternární komplex signalizuje přes membránu a aktivuje signální dráhu JAK/STAT.¹⁻³

Rovnovážná disociační konstanta, K_d , pro vazbu IFN- γ na receptor 1 je v nanomolární oblasti, kolem 10 nM, a ukazuje na vysoce specifickou vazbu. Proč zvyšovat vzájemnou afinitu mezi IFN- γ a IFN- γ -R1, která je už přirozeně poměrně vysoká? Základní motivace jsou dvě, první v zásadě metodická, druhá alespoň potenciálně praktická. Možnost předpovědět vliv mutací složitěho proteinu na jeho interakci s partnerskou molekulou počítačovým modelováním je velmi lákavá. K takové počítačové předpovědi je potřebné znát strukturu studovaného komplexu nebo alespoň izolovaných složek. Pokud jsou tyto struktury známy je možné mutace počítačově modelovat mnohem rychleji a výrazně levněji než je realizovat experimentálně.⁴ Druhá, prakticky orientovaná motivace ke studiu systému IFN- γ s receptorem 1 je reakcí na potřebu vysoce afinního analytického systému, který by byl schopen detekovat přítomnost IFN- γ i ve velmi nízkých koncentracích.

Strategie návrhu mutací

Počítačové modelování musí být rychlé a „levné“, to znamená nevyžadovat velké investice na počítačové

a programové vybavení a být proveditelné co nejmenším počtem pracovníků. Aby byly počítačové modely spolehlivé, je potřeba vycházet ze správné prvotní představy o struktuře interagujících molekul. V praxi to znamená, že je nutná znalost krystalové struktury nebo několika takových struktur. V našem případě jsou dostupné krystalové struktury samotného IFN- γ , databázové kódy v Protein Data Bank (PDB⁵) 1hig⁶ a 1eku⁷, ale hlavně krystalové struktury komplexů IFN- γ s receptorem 1, PDB kódy 1fg9⁸ a 1fyh⁹.

Vlastní protokol pro předpovědi mutací je koncepčně velmi jednoduchý, i když je zde pro přehlednost popsán s určitým zjednodušením. V krystalových strukturách komplexů 1fg9 a 1fyh jsme na základě jednoduchého kritéria vzdálenosti určili, která aminokyselinová residua receptoru interagují s IFN- γ , a ta jsme počítačově mutovali za použití programů založených na empirických modelech interakční volné energie. Jmenovitě jsme použili program FoldX¹⁰ (<http://foldx.crs.es>) a molekulárně dynamický program Gromacs¹¹, kterým byly struktury mutované FoldX-em ekvilibrovány. Protože s IFN- γ reaguje čtyřicet receptorových aminokyselin a každou aminokyselinu je možné zaměnit za všech devatenáct zbývajících, vypočetli jsme celkově matici hodnot $\Delta\Delta G$ o rozměrech 40x19, respektive se zahrnutím mutací na sebe sama o rozměrech 40x20. Pro další zkoumání byly potom vybrány mutace, které maximálně snižovaly hodnoty $\Delta\Delta G$, čili ty, které maximálně stabilizovaly interakci mezi receptorem a IFN- γ . Z praktických důvodů bylo nakonec vybráno celkem čtrnáct stabilizujících mutací.

Měření interakcí mezi IFN- γ a mutovanými receptory

Všech čtrnáct navržených mutant bylo následně úspěšně zkonstruováno a exprimováno jako rekombinantní proteiny v bakterii *Escherichia coli*, purifikováno a refoldováno. Interakce těchto proteinů s IFN- γ byla měřena experimentální technikou povrchové plasmonové resonance, anglicky surface plasmon resonance, často zkracováno jako SPR. Jde o metodu, která s vysokou citlivostí měří kinetiku interakce mezi biomolekulami. V prvním kroku analýzy se na povrch měřicího čipu chemickou nebo silnou a specifickou nevazebnou interakcí naváže jedna z interagujících molekul, tzv. ligand. V druhém kroku se v reálném čase měří odezva na interakci s partnerem, který je přes čip se

zakotvenou molekulu protéká v roztoku jako tzv. analyt. Měření poskytuje kinetické údaje o interakci, tedy rychlostní konstantu asociace k_{on} a rychlostní konstantu disociace k_{off} . Rovnovážná disociační konstanta K_d se pak spočte jako $K_d = k_{off}/k_{on}$. Měření byla provedena na komerčně dostupném přístroji ProteOn firmy BioRad.

Ze čtrnácti navržených a měřených mutant, čtyři prokázaly silnější interakce s IFN- γ , z toho u dvou bylo změřeno přibližně pětinasobné zvýšení aktivity, dále u dvou mutant nedošlo v podstatě k žádné změně vazebné aktivity a u osmi mutant se afinita snížila. Výsledek je diskutován níže.

Porovnání předpovězených a měřených afinit

Jedním z cílů práce bylo ověřit spolehlivost počítačových předpovědí. Změřené hodnoty rovnovážných konstant K_d jsme proto porovnali s vypočtenými hodnotami změn volné energie interakce $\Delta\Delta G$. To je možné pomocí vztahu $\Delta G = -RT\ln(K_d)$:

$$\begin{aligned}\Delta\Delta G &= \Delta G_{WT} - \Delta G_{mut} = -RT\ln(K_d)_{WT} + RT\ln(K_d)_{mut} = \\ &= -RT\ln(K_d)_{mut}/(K_d)_{WT}\end{aligned}$$

Indexy „WT“ se vztahují k receptoru divokého typu („wild type“) a „mut“ k mutantům. Vypočtené a změřené hodnoty $\Delta\Delta G$ jsou pro vybrané mutanty porovnány v Tabulce, záporné hodnoty $\Delta\Delta G$ znamenají, že mutant se váže na IFN- γ silněji než divoký typ.

Tabulka afinit mezi IFN- γ a jeho receptorem 1.

Uvedeny jsou změny interakční volné energie ΔG mutant vzhledem k přirozené variantě, čili hodnoty $\Delta\Delta G$. Hodnoty vypočtených $\Delta\Delta G$ byly získány programem FoldX¹⁰, změřené hodnoty pocházejí z experimentů povrchové plasmonové resonance, SPR.

Hodnoty odhadnutých chyb experimentu, esd, ukazují na poměrně přesná měření. Residua receptoru 1 jsou číslována jako v položce P15260 databáze UniProt. Ukázány jsou hodnoty pro čtyři z celkem čtrnácti navržených a připravených mutant.

Evidentně špatná shoda předpovězených a změřených interakčních volných energií, respektive jejich změn, ukázaná v Tabulce naznačuje nízkou kvalitu předpovědí. Rovněž malý počet mutant, u kterých se potvrdilo zvýšení afinity, čtyři, a existence osmi mutant, které mají afinitu dokonce nižší než divoký typ receptoru, se zdá podporovat negativní hodnocení projektu. Takové hodnocení je ale předčasné. Jednoduchými výpočetními technikami, které pracují s řadou silně zjednodušujících předpokladů, se totiž podařilo dosáhnout u dvou, ze čtrnácti mutant, pětinasobného zvýšení afinity. To je v nanomolární oblasti významné zvýšení afinity a těžko se dá přisoudit náhodné vhodné volbě mutace (připomínáme, že bylo výpočetně testováno na osm set mutací), jak je ostatně diskutováno i v nedávné práci.¹²

Závěr

Domníváme se, že zde představená studie dokládá, že poměrně jednoduchými a veřejně dostupnými, neplacenými počítačovými nástroji je možné navrhnout mutanty zvyšující významně afinitu mezi poměrně složitými proteinovými molekulami. Ve zde diskutovaném projektu se z malého počtu navržených mutací receptoru 1 IFN- γ podařilo nalézt mutanty s afinitou významně vyšší než má divoká forma receptoru a to s úspěšností lepší než 10 %. V budoucnu je třeba objasnit zvýšení afinity mechanisticky, ideálně na krystalové struktuře komplexu IFN- γ s vysoko-afinním mutantem receptoru 1 a dále zjistit, zda vyšší afinita mutantů receptoru 1 má biologické konsekvence pro signalizaci IFN- γ .

Mutace	Vypočtené $\Delta\Delta G$	Změřené $\Delta\Delta G$	esd
[kJ/mol]	[kJ/mol]	[kJ/mol]	[kJ/mol]
N96W	– 9.9	– 3.9	0.2
H222R	– 6.9	– 0.1	0.2
N96W+H222R	– 7.1	– 5.0	0.2
N70G+S95R+H222R	– 15.8	+ 0.5	0.1

Poděkování. Grantové agentuře ČR děkujeme za podporu prostřednictvím grantu P305/10/2184 a Biotechnologickému ústavu AV ČR za institucionální podporu AV0Z50520701.

Literatura

1. Gray PW, Goeddel DV. Nature 298, 859 (1982).
2. Muller U, Steinhoff U, Reis LFL, Hemmi S, Pavlovic J, et al. Science 264, 1918 (1994).
3. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, et al. Nat Rev Drug Discov 6, 975 (2007).
4. Fleishman SJ, Whitehead TA, Strauch EM, Corn JE, Qin SB, et al. 2011. J. Mol. Biol. 414, 289 (2011).
5. Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, et al. Acta Cryst. D 58, 889 (2002).
6. Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S, Carson M, Nagabhushan TL, et al. Science 252, 698 (1991).
7. Landar A, Curry B, Parker MH, DiGiacomo R, Indelicato SR, et al. J. Mol. Biol. 299, 169 (2000).
8. Thiel DJ, le Du MH, Walter RL, D'Arcy A, Chene C, et al. Structure 8, 927 (2000).
9. Randal M, Kossiakoff AA. Structure 9, 155-63 (2001).
10. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L. Nucleic Acids Res. 33, W382-W8 (2005).
11. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E. J. Chem. Theor. Comput. 4, 435 (2008).
12. Clark LA, Boriack-Sjodin PA, Eldredge J, Fitch C, Friedman B, et al. Protein Science 15, 949 (2006).

Souhrn

Mikulecký P., Černý J., Biedermannová L., Petroková H., Kuchař M., Malý P., Vondrášek J., Šebo P. a Schneider B.: Racionální návrh mutací zvyšující afinitu vazby mezi proteiny. Případová studie pro receptor 1 interferonu- γ .

Počítačová předpověď proteinových mutací vedoucí ke zvýšení jejich afinity k cílovému proteinu není běžně používán, ale užitečný nástroj proteinového inženýrství. Zde ukazujeme, že dostupnými výpočetními prostředky je možné předpovědět zvýšení afinity receptoru 1 k interferonu- γ . U dvou, ze čtrnácti předpovězených mutantů, došlo k pětinasobnému zvýšení disociační rovnovážné konstanty K_d jak bylo ukázáno měřením povrchovou plasmonovou resonancí, SPR.

Klíčová slova: interferon- γ , receptor 1

Summary

Mikulecký P., Černý J., Biedermannová L., Petroková H., Kuchař M., Malý P., Vondrášek J., Šebo P. and Schneider B.: Rational design of mutants with increased affinity. Case study of Receptor 1 of interferon- γ .

Computer design of mutations increasing affinity to the target protein is not a standard but useful tool of protein engineering. Here we show that it is possible to apply relatively simple and accessible computer techniques based on empirical potential to predict mutants of receptor 1 to interferon- γ . Two out of fourteen designed mutants showed about five-fold increase of dissociation equilibrium constant K_d as measured by surface plasmon resonance, SPR.

Keywords: interferon- γ , receptor 1

TRANSGENNÍ MYŠÍ MODELY A ENCYKLOPEDIE FUNKCE GENŮ

Radislav Sedláček

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha, radislav.sedlacek@img.cas.cz

Kontinuální vývoj nových transgenních technologií, stejně jako znalost genomu myši a člověka, vytvořil z myši zřejmě nejlepší zvířecí model pro biomedicínský výzkum. Asi největší předností tohoto modelu, ve srovnání s modely jako jsou např. červ *Caenorhabditis elegans* nebo moucha *Drosophila melanogaster*, je jeho velmi dobrá srovnatelnost s lidským organismem, s jeho fyziologií, vývojem, chováním i řadou nemocí. Zároveň mohou být myší modely ekonomicky produkovány a efektivně zkoumány ve srovnání se zvířecími modely jako je např. potkan, prase nebo opice; výhodou je i velké množství geneticky homogenních inbredních linií. Dalším důležitým faktem při etablování myši jako modelu pro výzkum lidských genů a jejich fyziologických a patologických funkcí, je také to,

že myši jsou vybaveny většinou genů, které má k dispozici i člověk; tyto dva druhy sdílejí více než 99 % genů. Geneticky upravený myší model tak může poskytovat unikátní možnost studia změněného genotypu (např. selektivní delece genu) a jeho vlivu na fenotyp (vyjádření genů).

Nemalý vliv na využití myši jako modelu pro výzkum funkce genů, a to i lidských, měl vývoj transgenních technologií. Při identifikaci „genu-kandidáta“ pro určitou funkci v lidském organismu se již po dvě desetky let připravují myší modely, aby se potvrdila funkce genu v organismu experimentálně.

Od prvních publikací na počátku osmdesátých let minulého století, ke kterým se datuje počátek genových manipulací, se technologie a znalosti manipulace

genomu výrazně zlepšila a v současnosti tyto technologie nabízejí možnost tvorby kvalitních transgenních modelů, které odrážejí znalost jejich exprese v čase i specifických tkáních (tzv. kondicionální mutanti) i možnosti výměny myších genů za lidské (tzv. humanizované myší modely). Vývoj technologií, které efektivně umožňují pozměnit genetickou výbavu (u myších modelů nejdříve), byl oceněn udělením Nobelovy ceny v roce 2007; toto ocenění převzali: Martin Evans, Oliver Smithies, Mario Capecchi¹.

Vývoj transgenních technologií sledoval dva hlavní přístupy. Nejdříve to bylo uplatňování konvenční technologie pomocí tzv. pronukleární injekce (injekce do prvojádra), která představuje technologii rychlou a ekonomickou. Tato technologie však může mít ve svých jednodušších formách řadu negativních efektů, zejména velkou variabilitu fenotypu transgenu zapříčiněnou jeho náhodnou inzercí. Tento negativní efekt může být do určité míry minimalizován použitím insulátorových sekvencí nebo použitím velkých konstruktů DNA jako je např. „bacterial artificial chromosome“, tzv. BAC.

Technologie využívající pronukleární injekce

Základním a nejjednodušším postupem při tvorbě transgenního myšího modelu je injekce DNA-konstruktu do prvojádra (pronukleus), přičemž podstatné části takového konstruktu tvoří cDNA zkoumaného genu, promotor řídící expresi, poly-A signál a případně nějaká intronová sekvence. Tento konstrukt se začlení do genomové DNA, přičemž téměř nemůžeme ovlivnit počet inzercí a jejich místo. Může tak teoreticky dojít i k poškození nějakého genu a o síle exprese rozhoduje právě místo inserce a počet kopií transgenu. Tento postup, i přes své nedostatky, se díky své jednoduchosti a ekonomické stránce stále využívá. Existuje navíc několik modifikací a nových postupů, které negativní stránky této technologie zmenšují nebo eliminují.

BAC-recombineerin:

Právě snaha získat více informací o regulaci funkce genu se odrazila v používání technologie BAC-recombineering, která umožňuje manipulaci s velkými fragmenty DNA za pomoci rekombinace². Touto technologií lze do genomu začlenit celé geny nebo i více genů, včetně jejich promotorových oblastí. Takové transgeny pak umožňují studovat fyziologickou expresi daného genu v buňkách, které studovaný gen skutečně exprimují. Zároveň je možno touto technologií začlenit do genů i bodové mutace nebo fluorescentní značku k označení specifických buněčných populací, nebo lze vytvořit např. fúzní protein k jeho izolaci z tkání či buněk. Tak je možno jednodušeji izolovat exprimovaný protein, zvláště když neexistují jiné potřebné molekulárně-biochemické nástroje k jeho izolaci. Zajímavou a velmi užitečnou variací BAC-recombineeringu je vnesení Cre-rekombinázy za nějaký specifický promotor. Cre-rekombináza je pak využita při generaci tkáňově specifických delecí.

Insulátory:

Insulátory představují určité elementy v sekvencích DNA, které mají schopnost chánit geny před vlivy okolních sekvencí³. Jednou z možností, jakým insulátory chrání exprimovaný gen je inhibice aktivity nějakého distálního promotorového zesilovače (tzv. enhancer) v případě, že se insulátor nachází mezi promotorem a enhancerovou sekvencí. Taková aktivita insulátoru může efektivně bránit enhancerové sekvenci v aktivaci přilehlého genu. Druhou možností působení insulátorů je jejich bariérová funkce, při které brání chromatinu v další kondenzaci a tak působí proti umlčování (silencing) genové exprese.

Indukovatelné myší transgenní modely:

V oblasti transgenze pomocí pronukleární exprese se v posledních letech dále vyvíjela technologie indukované exprese transgenu⁴. Byla vyvinuta řada možností, z nichž se nejčastěji používají systémy indukovatelné tetracyklinem či jeho deriváty anebo indukovatelné tamixofenem. Zatímco tetracyklinový systém je používán nejvíce pro indukci exprese studovaného genu pod kontrolou tkáňově specifického promotoru, použití tamixofenu převažuje při inaktivaci kondicionální alely. Oba systémy pak většinou fungují na základě exprese dvou transgenních systémů, k čemuž je potřeba křížení dvou transgenních linií: jedna exprimuje ligandově-závislý efektor (transaktivátor) a druhý exprimuje transgen pod kontrolou efektoru.

Tetracyklinový (Tet) systém je založen na využití operonu Tn-10 tet-rezistence bakterie *Escherichia coli*, přičemž tet-represor (TetR) tvoří fúzní protein s transaktivační doménou proteinu VP16 z herpes-simplex viru, čímž vzniká transaktivátor (tTA) kontrolovaný přítomností tetracyklínu. V jeho nepřítomnosti, nebo v nepřítomnosti doxycyklinu (Dox) se tTA váže specificky na konsenzuální sekvenci v tetracyklínovém operátoru (tetO) a tak aktivuje transkripci transgenu⁴. Naopak, po přidání Dox k tomuto systému je indukována konformační změna v tTA efektoru, která zabraňuje jeho navázání na regulační sekvenci DNA a tak je jeho transkripce umlčena. Tet systém byl vyvinut i v reverzní variantě, kdy je exprese transgenu za přítomnosti doxycyklinu naopak spuštěna. Oba systémy, tj. Tet_{ON}/Tet_{OFF}, se nyní také využívají k regulaci exprese Cre-rekombinázy, umožňující tak kondicionálně kontrolovat např. delecí genu či jeho části lemované loxP místy, které Cre rekombináza specificky rozeznává (viz níže). Alternativním systémem využívaným ke kontrole rekombinace je systém využívající tamixofen. Tento systém je založen na vázání ligandu na estrogenový receptor a jeho funkční přesun do jádra buňky. Pozměněná forma domény odpovědné za vázání ligandu estrogenového receptoru (ER) byla fúzována s Cre-rekombinázou a tento mutovaný ER neváže svůj přirozený ligand, beta-estradiol, ale právě syntetický ligand, tj. tamoxifen nebo 4-hydroxy-tamoxifen. V nepřítomnosti ligandu je fúzní protein Cre-ER lo-

kalizován v cytoplasmě vázaný na *heat-shock* protein Hsp90, kde Cre-rekombináza nemůže působit. Po administraci syntetického ligandu je pak Cre-ER uvolněn z vazby na Hsp90 a translokuje se do jádra, kde Cre-rekombináza může vykazovat svou specifickou aktivitu po rozeznání loxP míst v DNA. Vazebná doména ligandu u Cre-ER byla dále mutována a v současnosti se pro dočasnou indukci aktivity Cre-rekombinázy používá mutovaná varianta označovaná jako Cre-ER^{T2}.⁵

Zinc-fingers a TALE-nukleázy:

Rozvoj technologií homologní rekombinace a kultivace pluripotentních embryonálních kmenových buněk vedly i ke zkvalitnění přípravy kondicionálních mutantů. Proto je dnes dávana těmto technologiím stále větší přednost před technologiemi pronukleární injekce (i když jsou ekonomicky méně náročné). K renesanci této technologie však dochází s tím, jak se v poslední době rozvíjí specifické zacílování genů pomocí „zinc-finger“ nukleáz (ZFN) nebo pomocí tzv. „TAL effectorových“ nukleáz (TALEN; *transcription activator-like effector nucleases*). Obě technologie využívají podobný mechanismus vazby nukleázy na zacílenou oblast DNA. ZFN využívají páru „zinc-finger“-konstruktů, které mají dvě základní domény: DNA-vazebnou doménu obsahující řadu „zinc-finger“ ve dvou modulech, které specificky rozeznávají hexamerovou (6 bp) sekvenci zacílené DNA-oblasti, a také doménu odpovídající za rozštěpení DNA (*DNA-cleaving domain*), která obsahuje nukleázovou doménu enzymu Fok I. TALEN nukleázy jsou pak obdobné, uměle-konstruované, fúzní proteiny obsahující DNA-vazebnou doménu, jejíž mnohonásobné repetice zajišťují specifickou vazbu na určitou vybranou sekvenci DNA a doménu nukleázy Fok I stěpící DNA mezi párem TALENů.

Pomocí výše popsaných nukleáz je možné nejen štěpit specifické sekvence genomové DNA a vytvořit tak nefunkční geny, ale je možné vkládat dlouhé DNA-úseky pomocí homologní rekombinace i krátké oligonukleotidy, které mohou obsahovat např. korigovanou sekvenci. Tyto možnosti se zdají být velmi efektivní ve srovnání s dalšími transgenními technologiemi.

„Gene-targeting“ a tvorba knock-out, knock-in a knock-down mutantů

Specifické poškození genu, jež vede k nefunkčnímu produktu genu (proteinu) nebo pozměně funkci, je od zavedení technologií homologní rekombinace a manipulace s embryonálními kmenovými buňkami stále více využíváno k charakterizaci funkce genů *in vivo*, tj. v celé komplexitě organismu. K přesnému zacílení genu, resp. jeho nejdůležitější části (např. katalytické místo), je potřeba vytvořit konstrukt, který obsahuje: 1/ Homologní raménka (homology arms) lemující místo, které chceme modifikovat. DNA ležící mezi těmito raménky je v průběhu rekombinace deletována. 2/ Selekcí a reportérovou kazetu, která je

v nejjednodušší variantě využívána k pozitivní selekci rekombinovaných klonů embryonálních kmenových buněk; k pozitivní selekci se využívá např. neomycin-fosfotransferázového genu (neo), který buňkám uděluje rezistenci proti léku označovanému jako G418 (geneticin); v komplikovanější formě obsahuje tato kazeta i reportérové geny (např. lacZ reportér) ke studiu exprese studovaného genu v tkáních. 3/ Kazetu negativní selekce, jejímž hlavním účelem je eliminace náhodných-nehomologních inzercí. Kazeta využívá např. tymidin-kinázu (tk) z herpes simplex viru (HSV) nebo toxin difterie (DT-A) umístěné v konstruktu mimo oblast homologie; některé novější konstrukty/strategie negativní selekci nevyužívají. 4/Místa pro specifickou rekombinaci, která jsou využívána nejčastěji v kombinaci s rekombinázami Cre a Flp, tj. loxP a FRT místa; jejich použití v konstruktu závisí na komplexitě kazety a na strategii. V dnešní době se hojně využívá duální Cre/Flp strategie, při níž Flp-rekombináza odstraňuje selekcí kazetu a Cre-rekombináza pak deletuje exon nebo část genu mezi zbývajícími loxP místy.

Systémy Cre-loxP a Flp-FRT patří v současnosti ke standardně využívaným technologiím při tvorbě kondicionálních alel, s jejichž použitím lze studovat funkci určitého genu ve specifické tkáni nebo potřebnou delecí genu indukovat. Při těchto studiích se využívá křížení tzv. „floxovaného“ („floxed exons“) mutantu s transgenní myší exprimující Cre-rekombinázu pod kontrolou některého ze specifických tkáňových promotorů. Tak je možno floxované exony deletovat specificky v mnoha tkáních či specifických buněčných typech.

Encyklopedie funkcí genů

V současné době, tj. v postgenomickém období, kdy jsou dostupné sekvence lidských, myších i dalších genomů, se zvyšuje úsilí poznat funkce každého jednotlivého genu a v tomto úsilí dominují myší mutantní modely s kondicionálně-zacílenými geny (6). Během další dekády by měly být vyprodukovány myší mutanti, u nichž by všechny geny byly kondicionálně deletovány a zároveň by každý z těchto mutantů měl být individuálně fenotypován (charakterizace funkce genu), tak abychom dostali souhrnný obraz funkce genů v organismu. Jelikož 99 % myších genů odpovídá genům lidským, práce na myších mutantech má přinést základní poznatky o funkci lidských genů. K dosažení tohoto cíle, jehož důsledky jsou mnohem důležitější než samotná znalost sekvencí genů, vzniklo několik mezinárodních konsorcií jako INFRAFRONTIER (pan-evropské konsorcium) a IMPC (International Mouse Phenotyping Konsorcium; celosvětové konsorcium), které sdružují přední světové instituce a které pracují na vytvoření *Encyklopedie funkcí savčích genů* (*Encyclopedia of mammalian gene function*)⁷. Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i. a BIOCEV se stávají součástí těchto konsorcií a na tomto prestižním projektu se již podílejí.

Literatura

1. Manis, JP: The New England journal of medicine 357, 2426 (2007).
2. Poser, I, Sarov, M, Hutchins, JR, et al.: Nature methods 5, 409 (2008).
3. West, AG, Gaszner, M and Felsenfeld, G: Genes & development 16, 271 (2002).
4. Bockamp, E, Maringer, M, Spangenberg, C et al.: Physiological genomics 11, 115 (2002).
5. Jullien, N, Goddard, I, Selmi-Ruby, S et al.: Genesis 46, 193 (2008).
6. Skarnes, WC, Rosen, B, West, AP et al.: Nature 474, 337 (2011).
7. Brown, SD and Moore, MW: Disease models & mechanisms 5, 289 (2012).

Souhrn

Sedláček R.: Transgenní myší modely a encyklopedie funkce genů

Transgenní myši představují výjimečně užitečné modely ke studiu funkce genů v kontextu celého organismu. Článek shrnuje hlavní přístupy používané při tvorbě různých typů transgenních myších modelů a diskutuje současné perspektivy výzkumu v této vědecké oblasti. Hlavním vědeckým cílem, jehož chce dosáhnout mezinárodní konsorcium uznávaných vědeckých institucí, je vytvoření komplexní virtuální encyklopedie funkcí savčích genů.

Klíčová slova: transgenní myší modely, funkce savčích genů

Summary

Sedláček R.: Transgenic mouse models and encyclopedia of gene function

Transgenic mice are exceptionally useful models to study a gene's functions in a whole body context. This article summarizes the main approaches that are used to generate different types of transgenic mouse models and discusses current prospects of the research field. A major research goal, led through the efforts of an international consortium of recognized scientific institutions, is the creation of a comprehensive virtual encyclopedia of mammalian gene function.

Keywords: transgenic mouse models, gene function

O B S A H

Úvodem	21
Víte, že...?	22
Baxa M.: Transgenní miniaturní prase jako model ke studiu Huntingtonovy choroby	23
Eyer L., Fránek M.: Nanoprotilátky: nové imunoreagenty pro výzkum, diagnostiku a terapii	25
Hošek P.: Biotechnologické systémy pro jednorázové použití	31
Mikulecký P., Černý J., Biedermannová L., Petroková H., Kuchař M., Malý P., Vondrášek J., Šebo P. a Schneider B.: Racionální návrh mutací zvyšující afinitu vazby mezi proteiny. Případová studie pro receptor 1 interferonu-γ	35
Sedláček R.: Transgenní myši modely a encyklopedie funkce genů	37

C O N T E N T S

Editorial	21
Do you know ... ?	22
Baxa M.: Transgenic Miniature Pig as a Model for the Study of Huntington's Disease	23
Eyer L., Fránek M.: Nanobodies: new immunoreagents for research, diagnostics and therapy	25
Hošek P.: Single-use biotechnological systems	31
Mikulecký P., Černý J., Biedermannová L., Petroková H., Kuchař M., Malý P., Vondrášek J., Šebo P. and Schneider B.: Rational design of mutants with increased affinity. Case study of Receptor 1 of interferon-γ	35
Sedláček R.: Transgenic mouse models and encyclopedia of gene functions	37

POKYNY PRO AUTORY

Rukopisy je třeba zaslat v elektronické formě e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Rukopis musí být opatřen plným jménem autora, názvem jeho pracoviště a e-mailovou adresou autora.

Článek má tyto části: název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr (příp. poděkování), citace literatury, český souhrn, klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova.

Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu práce, a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Seznam citací musí být uveden v závěru článku. Zkratky časopisů se používají podle Chemical Abstract Service Source Index.

Příklad: Guest JD, Rao A, Olson L, et al.: *J.Biochem.* 148, 502 (1997).

Novák Z.: Diplomová práce. VŠCHT, Praha 2008.

Lowestein K A: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 1979.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics>, staženo 3. září 1999.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi. Každý obrázek musí být opatřen legendou umístěnou pod obrázkem, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky zasílejte **zvlášť** v některém z běžných formátů např. TIF, JPG, CDR, EPS.

Technické parametry: typ písma Arial velikost 11, řádkování jednoduché.

BIOPROSPECT

Vydavatel:
BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST
Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:

MK ČR E 19409

Tiskne:
Venice s.r.o.
Za Hanspaulkou 13/875
160 00 Praha 6

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností