Akceptuję
W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej Polityce Prywatności

Terapia genowa – czym jest i jej perspektywy

Streszczenie

Rozwój inżynierii genetycznej zaowocował powstaniem nowego nurtu w lecznictwie, polegającego na wprowadzaniu do organizmu obcych kwasów nukleinowych w celach terapeutycznych. Na przestrzeni ostatnich 20 lat trwały intensywne badania nad skutecznością metod i bezpieczeństwem ich stosowania. Aktualnie terapia genowa nastawiona jest na dwa tematy: rekompensacja defektów genetycznych poprzez wprowadzenie właściwych sekwencji DNA oraz wyciszanie ekspresji tych genów, których produkty białkowe są szkodliwe dla organizmu. Mimo mnogości dostępnych technik, zarówno niewirusowych, jak i wirusowych oraz nieustannego rozwoju metodologii zastosowanie tej terapii w praktyce jest znacznie trudniejsze niż początkowo przypuszczano. Obecnie terapia genowa

ma charakter głównie eksperymentalny. Wyzwaniem dla naukowców jest uczynienie z niej metody skutecznej i w pełni bezpiecznej dla pacjentów.

Słowa kluczowe: *terapia genowa, wektory wirusowe, wektory plazmidowe*

Wstęp

U wszystkich organizmów żywych informacja genetyczna zawarta jest w kwasach nukleinowych, u większości z nich jest to DNA, czyli kwas deoksyrybonukleinowy. To specyficzne sekwencje zasad w DNA stanowią instrukcję do tworzenia białek, a zarazem determinują naszą przynależność do gatunku, wygląd i funkcjonowanie organizmu. Taką informację posiada każda komórka, co umożliwia organizmowi prawidłowe funkcjonowanie. Problem zaczyna się wtedy, gdy informacja zawarta w DNA zostanie zmieniona poprzez mutację. Może wtedy dojść do niepożądanych zmian w ilości lub strukturze białek, prowadzących do poważnych dysfunkcji organizmu. Już w latach 1902 – 1909 A. Garrod odkrył, iż defekty genetyczne powodujące utratę enzymu są przyczyną dziedzicznych chorób metabolicznych. Wiele lat później S. Cohen i H. Boyer opracowali podstawy inżynierii genetycznej, która umożliwiła narodzenie się nowego nurtu, pozwalającego na leczenie tego typu schorzeń już u samego ich podłoża, na poziomie sekwencji DNA [3].

Termin „terapia genowa” został wprowadzony przez Elizabeth i Wacława Szybalskich, naukowców, którzy w roku 1962 po raz pierwszy przeprowadzili transformację genetyczną komórek eukariotycznych. Dzięki zastosowaniu roztworu fosforanu wapnia udało im się wprowadzić fragmenty genomowego DNA do ludzkich komórek szpiku [9,10]. Natomiast pierwszy przykład zastosowania samej terapii genowej u człowieka miał miejsce we wczesnych latach 90-tych zeszłego stulecia w USA. Leczenie dotyczyło ciężkiego niedoboru odporności spowodowanego mutacją w genie deaminazy adenozynowej (ADA) i polegało na transferze prawidłowego genu ADA do limfocytów czteroletniej pacjentki. Od tej pory do roku 2004 przeprowadzono ponad 900 prób klinicznych terapii genowej na całym świecie, większość z nich w USA, Wielkiej Brytanii, Niemczech i Szwajcarii, do roku 2007 było ich już 1200, a w chwili obecnej prowadzonych jest 1714 prób klinicznych terapii genowej na całym świecie [17]. Mimo tak wielkiej ilości prób i doświadczeń terapia genowa nadal pozostaje eksperymentalną dziedziną medycyny. Większość strategii i metod transformacji komórek jest na etapie doświadczeń laboratoryjnych [7,13].

Wyróżniamy dwa typy terapii genowej: germinalny i somatyczny. Pierwszy typ dotyczy komórek, z których rozwija się nowy organizm, czyli gamet oraz komórek we wczesnym stadium zarodkowym. Wiąże się to z dziedziczeniem wprowadzonych sekwencji, zwłaszcza, że w tym wypadku dochodzi do integracji terapeutycznego genu z genomem biorcy. Zatem zaistniała w genomie rodzica mutacja, powodująca chorobę, przestaje istnieć a dzieciom przekazywany jest właściwy gen. Terapia germinalna budzi jednak wiele kontrowersji i wątpliwości etycznych. Obecnie uznano, iż ryzyko manipulacji w liniach ludzkich komórek rozrodczych przewyższa możliwe korzystne skutki tego zabiegu i doświadczenia tego typu są prawnie zakazane.

Terapia somatyczna, jak sama nazwa wskazuje, dotyczy komórek somatycznych, czyli wszystkich komórek ciała poza gametami. Wprowadzenie genu do komórek ciała powoduje złagodzenie lub

usunięcie skutków mutacji, jednakże dotyczy to tylko i wyłącznie danego pacjenta. Zmiany w DNA komórek somatycznych nie są dziedziczne. Mimo, że chory zostaje wyleczony, w jego komórkach rozrodczych nadal występuje gen uszkodzony i to on przekazywany jest następnym pokoleniom [7,16].

Założenia terapii genowej

Terapia genowa jest to „leczenie, polegające na wprowadzeniu obcych kwasów nukleinowych (DNA lub RNA) do komórek ciała, w celu uzyskania określonego efektu", zatem w celu zrekompensowania komórkom mutacji, które zaszły w ich własnym genomie. Pożądanym efektem jest oczywiście usunięcie szkodliwych dla organizmu skutków mutacji. Można to uzyskać na różne sposoby. Preparat wprowadzony do komórek może zawierać kompletny gen, najczęściej w postaci cDNA (bezintronowej sekwencji kodującej określone białko) lub jedynie krótkie fragmenty DNA lub RNA, kodującego lub niekodującego, zależnie od zamierzonego efektu *9+.

Terapia genowa, mimo że jest techniką bardzo nowoczesną, czerpiącą z najnowszych osiągnięć technologicznych, w swoich założeniach ma wiele wspólnego ze standardowymi metodami leczenia, np. farmakoterapią. Większość preparatów farmakologicznych zbudowanych jest na zasadzie substancja czynna/nośnik i dopiero po połączeniu tych dwóch faz uzyskać można właściwa formę leku wraz z jego właściwościami terapeutycznymi i farmakokinetycznymi. Terapia genowa, jako technika leczenia kwasami nukleinowymi, w zasadniczej większości przypadków opiera się na tym samym układzie substancji. Kwas nukleinowy (DNA lub RNA) stanowi zatem substancję czynną w terapii genowej, natomiast wektor (np. plazmid lub wirus) jest niczym innym jak nośnikiem substancji, który umożliwia wniknięcie terapeutycznych genów do tkanek lub narządów. Nośnik warunkuje ekspresję insertu w miejscu docelowym oraz stanowi ochronę dla substancji terapeutycznej [14].

W zależności od choroby, zastosowanie terapii genowej ma na celu naprawę wady genetycznej, zmianę aktywności poszczególnych genów (wyciszenie lub wzmocnienie aktywności), bądź też zahamowanie aktywności genu, w przypadku, gdy jego wzmożona ekspresja jest przyczyna choroby. W związku z powyższym, wyróżniono pięć głównych celów zastosowania terapii genowej w leczeniu:

1. Kompensacja defektu genetycznego – jeżeli w organizmie nie występuje dany gen wprowadza się prawidłową jego kopię. Ta strategia wykorzystywana jest także w przypadku, gdy gen nie funkcjonuje wystarczająco wydajnie. Wprowadzenie dodatkowych kopii danego genu pozwala wzmocnić efekt jego działania. Strategię tę można stosować w leczeniu chorób jednogenowych recesywnych, jak np. mukowiscydoza, anemia sierpowata, czy hemofilia.

2. Korekta mutacji punktowych lub genowych – polega na wprowadzeniu prawidłowego fragmentu genu lub wybranych nukleotydów w celu usunięcia skutków chorobowych zaistniałej mutacji. Prowadzone są próby zastosowania tej strategii w leczeniu chorób jednogenowych dominujących i recesywnych, m. in. pląsawicy Huntingtona.

3. Inaktywacja wybranych genów – tę strategię stosuje się w przypadku, gdy nieprawidłowa sekwencja danego genu powoduje powstanie wadliwie funkcjonującego białka lub nieprawidłowego RNA. W celu inaktywacji zmutowanych genów stosuje się preparaty zawierające antysensowne oligonukleotydy, struktury tripleks, Z-DNA, czy rybozymy, a obecnie także siRNA [1]. W tej strategii znalazły zastosowanie także niekodujące fragmenty DNA i RNA. Metodę tę stosuje się w przypadku chorób infekcyjnych, nowotworowych oraz jednogenowych dominujących.

4. Eliminacja nieprawidłowych komórek – do komórki wprowadza się geny „kierujące" ją na drogę

samozniszczenia. Najczęściej stosuje się w tym celu cDNA kodujące białka toksyczne, czynniki proapoptotyczne lub immunostymulujące. Metoda ta znalazła zastosowanie w próbach leczenia chorób nowotworowych oraz infekcyjnych.
5. Nadanie komórkom nowych cech fenotypowych – wprowadzenie wektora ma na celu „zmuszenie" komórki do produkcji nowych białek lub nadania już istniejącym nowych funkcji. Przykładem użycia tego typu strategii jest terapia proangiogenna, którą stosuje się w leczeniu chorób układu krążenia [9,16].

Metody transferu DNA do komórki

Materiał genetyczny można wprowadzić do tkanek pacjenta wykorzystując jedną z dwóch dostępnych strategii: in vivo lub ex vivo. Strategia pierwsza polega na bezpośrednim transferze DNA do komórek chorego. Preparat genowy można podać do głównych naczyń rozprowadzających krew po całym organizmie lub do konkretnego narządu lub tkanki, np. śródskórnie, dootrzewnowo, doguzowo. W strategii ex vivo komórki pobierane są z organizmu pacjenta, a następnie hodowane w laboratorium. Tam zostają one poddane transformacji i selekcji, komórki zmodyfikowane namnaża się i podaje z powrotem do organizmu. Tego typu zabiegi możliwe są tylko w przypadku komórek, które łatwo można pobrać i hodować in vitro, np. komórek szpiku kostnego lub komórek macierzystych krwi [16].

Bez względu jednak na zastosowaną strategię transfer kwasów nukleinowych do komórek docelowych napotyka na wiele przeszkód. Pierwszą jest transport przez błonę komórkową. Zarówno plazmalemma, jak i cząsteczki DNA i RNA mają ładunek ujemny, co w znacznym stopniu utrudnia ich zbliżenie się do siebie. Ponadto kwasy nukleinowe mają silnie hydrofilowy charakter, co całkowicie uniemożliwia ich wniknięcie do komórki na drodze fuzji z lipidową błoną. W odpowiedzi na ten problem opracowano szereg metod mających ułatwić przedostanie się genów terapeutycznych do wnętrza komórki [9]. Najprościej podzielić te metody na dwie grupy wirusowe i niewirusowe. W systemie opartym na transferze genów za pomocą wirusów główną rolę odgrywają retrowirusy, adenowirusy, lentiwirusy i wirusy związane z adenowirusami (adenosatelitarne, AAV). Systemy niewirusowe związane są z transferem bądź „nagiego DNA" (np. plazmidowego), bądź DNA połączonego z nośnikiem (np. lipidowym)[1,2].

Bardzo ważnym zagadnieniem w temacie terapii genowej są plazmidy. Plazmidy są to koliste cząsteczki DNA zdolne do autonomicznej replikacji w komórkach gospodarza, niezależnej od replikacji chromosomów gospodarza. Naturalnie występują one w komórkach bakterii i grzybów. Metody inżynierii genetycznej pozwalają na wprowadzenie do plazmidów insertów, najczęściej w postaci cDNA genu, dzięki obecności charakterystycznych sekwencji rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne, tzw. polilinkera. W terapii genowej wykorzystuje się plazmidy ekspresyjne, czyli takie, które pozwalają na ekspresję wklonowanego do nich genu. W skład konstruktu plazmidowego wchodzi kaseta ekspresyjna, zawierająca promotor rozpoznawany przez polimerazę RNA gospodarza, insert genowy, który chcemy wprowadzić do komórki oraz sekwencję poliadenylacji, stabilizującą powstałe mRNA i chroniącą je przed degradacją. Plazmidowe wektory ekspresyjne zawierają także mocne replikony bakteryjne lub wirusowe, umożliwiające im efektywną replikację, oraz geny markerowe i reporterowe. Geny markerowe, np. oporność na antybiotyki, niezbędne są w celu selekcji komórek zawierających plazmid. Geny reporterowe to takie, których produkty białkowe mają właściwości fluorescencji (np. GFP), ich zadaniem jest ułatwienie analiz biochemicznych i molekularnych białek powstałych na matrycy transgenu *6,14+. Bardzo ważnym elementem tej konstrukcji jest promotor, od niego zależy efektywność i umiejscowienie ekspresji transgenu w komórce gospodarza. Wykorzystuje się różne typy promotorów, są to promotory konstytutywne, tkankowo specyficzne, indukowane (np. przez związki chemiczne), selektywne (ograniczone jedynie do jednego typu komórek, np. nowotworowych) i regulowane (np. cyklem

komórkowym) [14].

Konstrukty plazmidowe najczęściej uzyskuje się metodą lizy zasadowej stransformowanych bakterii Escherichia coli, do oczyszczenia stosując metody chromatograficzne. Pozwalają one na otrzymanie dużych ilości mRNA kodującego białko terapeutyczne *1]. Preparaty plazmidowe są bardzo szeroko wykorzystywane w próbach terapii genowej, zarówno w wirusowych i niewirusowych systemach transportu materiały genetycznego. W systemie wirusowym są one niezbędne do utworzenia rekombinowanych wektorów wirusowych. Zasadnicze znaczenie mają one właściwie we wszystkich strategiach niewirusowych, są także podstawowym narzędziem, umożliwiającym sklonowanie i namnożenie transgenu [9,14].

Systemy niewirusowe

Niewirusowe strategie transportu kwasów nukleinowych cieszą się dużym zainteresowaniem, ze względu na bezpieczeństwo stosowania w klinice i stosunkowo nieduże koszty *14].

Kwasy nukleinowe można wprowadzić do organizmu poprzez bezpośrednie wstrzyknięcie do tkanki roztworu DNA plazmidowego w soli fizjologicznej. Jest to tzw. „nagi DNA”. Ten system ma wiele zalet, plazmidy są, jak już wcześniej wspominano, tanie i proste w produkcji, a ich podanie do organizmu wywołuje znikome skutki uboczne. Można w ten sposób transformować komórki mięsni szkieletowych, kardiomiocyty oraz niektóre komórki skóry. Podanie nagiego DNA ma jednak wiele ograniczeń. Jednym z nich jest bardzo niski poziom ekspresji wprowadzonego genu w komórkach biorcy, ponadto w przypadku większości tkanek jest to metoda całkowicie nieskuteczna, nie można jej też stosować w transformacji komórek in vitro. W celu zwiększenia efektywności transformacji komórek nagim DNA, trwają badania nad tzw. metodą hydrodynamiczną. Polega ona na wstrzyknięciu do krwi dużej objętości roztworu plazmidowego DNA w krótkim czasie. Jednakże, z powodu ryzyka uszkodzenia narządów, raczej nie zostanie ona wprowadzona do leczenia człowieka [2,9].

Tak niska skuteczność transferu nagiego DNA do komórek, zaowocowała opracowaniem szeregu metod mających na celu ułatwienie jego wniknięcia do komórek. Metody te mogą byd fizyczne, biochemiczne lub biologiczne [9].

Metody fizyczne pozwalają na transfer plazmidowego DNA do komórki poprzez lokalne i odwracalne uszkodzenie plazmalemmy. Najczęściej stosowaną metoda fizyczną jest elektroporacja, która w celu wprowadzania kwasów nukleinowych do komórek była stosowana juz w latach 80-tych XX wieku. W wyniku poddania komórki impulsowi elektrycznemu w błonie powstają hydrofilowe pory o średnicy nieprzekraczającej pojedynczych nanometrów. Zaletą tej metody jest nie wprowadzanie do środowiska żadnych substancji, które mogą oddziaływać z komórką w niepożądany sposób [9,12]. Elektroporacja jest bardzo skuteczna, jednakże wiąże się z ryzykiem poważnego uszkodzenia komórek. Początkowo stosowano tę metodę jedynie in vitro, jednak to się zmieniło. Obecnie istnieją urządzenia, które pozwalają na wprowadzenie DNA poprzez elektroporację do komórek skóry, mięśni szkieletowych, a nawet wątroby [9]. W medycynie, by nie uszkodzić nieodwracalnie błony komórkowej, stosuje się impulsowe pole elektryczne. W tym przypadku elektropory są z reguły niestabilne i trudno dobrać takie warunki traktowania, żeby przez dłuższy czas utrzymać ich średnicę. Inną możliwą metodą jest elektroporacja przy stałym prądzie, jednak dotychczas stosowana była jedynie w badaniach na płaskiej dwuwarstwie lipidowej. Metoda ta różni się od impulsowej tym, że umożliwia długotrwałe utrzymanie elektroporów o stabilnej średnicy, które dodatkowo podlegają pełnej kontroli. Być w przyszłości wyprze ona stosowane dotychczas metody impulsowe [12].

Metody biochemiczne polegają na zastosowaniu nośników chemicznych, tworzących kompleksy

z kwasami nukleinowymi w celu zneutralizowania ich ujemnego ładunku. Tego typu kompleksy dostają się do wnętrza komórki najczęściej za sprawą fagocytozy, rzadziej w wyniku fuzji z plazmalemmą. Ponadto niektóre nośniki chemiczne ułatwiają uwolnienie kwasu nukleinowego z endosomu do cytoplazmy oraz chronią go przed nukleazami komórkowymi *9].

Pierwszym zastosowanym nośnikiem chemicznym był fosforan wapnia. Jest on stosowany do dziś, lecz rzadko, gdyż istnieją efektywniejsze metody chemiczne [9].

Znacznie skuteczniejszym, lecz także znacznie droższym nośnikiem chemicznym są liposomy kationowe, często też łączone z obojętnymi. Są one mało toksyczne, jednakże mogą wywoływać reakcję immunologiczną. Można je stosować zarówno in vitro, jak i in vivo, lecz mają wiele ograniczeń i właściwie, w porównaniu z wektorami wirusowymi, ich skuteczność właściwie jest niewielka. Wydajność transfekcji lipopleksów można zwiększyć stosując specyficzne ligandy wiążące się z receptorami na błonie komórkowej, z czego najbardziej efektywnym do tej pory okazało się przyłączenie do kompleksu białek osłonki wirusa grypy japońskiej.

Kolejną popularną grupą nośników chemicznych są oligodendrymery, czyli polimery aminowe. Mają one ładunek dodatni, dzięki czemu łatwo tworzą kompleksy z kwasami nukleinowymi, które następnie przedostają się do komórki na drodze fagocytozy. Metoda ta jest stosunkowo efektywna i bezpieczna, nie powoduje ani efektów cytotoksycznych, ani wzmożonej odpowiedzi odpornościowej. Oligodendrymery stosowane są jedynie w transformacji in vitro [9].

Systemy wirusowe

Podstawą do powstania wirusowych systemów transformacji komórek była naturalna zdolność wirusów do wprowadzania swojego materiału genetycznego do genomu gospodarza. Cząstki wirusowe należało tak zmodyfikować, by, po pierwsze, nie były szkodliwe dla chorego, po drugie, mogły efektywnie wprowadzić gen terapeutyczny do genomu pacjenta. Z genomu wirusa usuwane są geny odpowiedzialne za wirulencję oraz część genów odpowiedzialnych za jego replikację. Jest to ważne z dwóch powodów, by wektor stosowany w leczeniu nie wywoływał niepożądanej reakcji immunologicznej oraz, by nie namnażał się w komórkach chorego. Najbardziej pożądanym rozwiązaniem jest przekazanie genu terapeutycznego do jadra komórkowego a następnie degradacja pozostałości wektora *2,10]. Ze względu na budowę genetyczna podzielono wektory wirusowe na dwa rodzaje – rekombinowane i defektywne. Rekombinowany wektor wirusowy nosi obcy gen w swoim genomie. Jest to możliwe dzięki rekombinacji homologicznej, która tutaj wiąże się z delecją jednego lub więcej genów wirusa odpowiedzialnych za jego replikację w organizmie nosiciela. Tego typu wektory mogą byd namnażane jedynie w komórkach, które posiadają aktywne geny usunięte z wirusa. Do tego typu nośników należą adenowirusy i niektóre wektory oparte o wirusa opryszczki. Wirusowe wektory defektywne zamiast genomu wirusa posiadają w kapsydzie jedynie plazmid zawierający docelowy gen oraz sekwencje wirusowe odpowiedzialne za upakowanie DNA do kapsydu. Wektory rekombinowane zachowują wiele swoich naturalnych genów, podczas gdy wektory defektywne żadnego z wyjątkiem sekwencji umożliwiających umieszczenie plazmidu w otoczce białkowej [4]. System nośników wirusowych jest bardzo wydajny i do tej pory stosowany jest w większości przypadków, co stanowi ok. 80% wszystkich przeprowadzanych prób klinicznych terapii genowej [14].

Wektory retrowirusowe

Wektory retrowirusowe są jednym z najczęściej używanych narzędzi w transformacji komórek. Materiał genetyczny retrowirusów stanowi RNA, które po przedostaniu się do komórki gospodarza zostaje przepisane na DNA, dzięki czemu ulega integracji z genomem. Skutkiem tego wektory

stworzone na bazie retrowirusów warunkują stabilną ekspresję genu terapeutycznego. Ponadto wektory te łatwo się otrzymuje i modyfikuje *2]. Integracja genów terapeutycznych z genomem chorego jest także bardzo ważne w kontekście trwałości sekwencji, gdyż chroni kwasy nukleinowe przed degradacją przez endogenne nukleazy, znajdujące się w komórkach *9]. Do wektorów retrowirusowych można wprowadzić około 8 kb DNA. Najczęściej stosowanym retrowirusem jest wirus mysiej białaczki Moloneya (MLV), wektory oparte na tym wirusie mogą infekować wiele typów komórek i warunkują długotrwałą ekspresję wprowadzonych genów. Dzięki wprowadzeniu dodatkowych białek do osłonki możliwe jest zwiększenie powinowactwa wirusa do komórek docelowych. Wektory retrowirusowe mogą skutecznie wprowadzać materiał genetyczny do chromosomów gospodarza jedynie w czasie podziałów komórkowych. Jest to ograniczenie, które sprawia, że nie są to wektory uniwersalne. Ponadto mogą one być stosowane jedynie w strategii ex vivo. Wektory tego typu, mimo że nie indukują odpowiedzi immunologicznej, podane in vivo są całkowicie nieskuteczne, gdyż podlegają degradacji przez układ dopełniacza. Poważnym ryzykiem związanym ze stosowaniem wektorów retrowirusowych jest mutageneza insercyjna – retrowirusy wbudowują się w regiony o dużej zawartości genów, zwłaszcza te aktywne transkrypcyjnie. Nie można w żaden sposób kontrolować, w które miejsce w genomie wbuduje się wirus. Zatem mutageneza insercyjna może spowodować szereg niekorzystnych dla komórki oraz całego organizmu skutków. Jednym z nich jest zaburzenie ważnych zachodzących w komórce procesów, a obecne w wektorze sekwencje promotorowe i wzmacniające mogą spowodować inicjację rozwoju nowotworu, jeśli znajdą się w pobliżu onkogenów. Mimo to jest to aktualnie jedna z najczęściej stosowanych strategii terapii genowej w próbach klinicznych. Obecnie testuje się kilka strategii mających na celu zwiększenia bezpieczeństwa stosowania wektorów retrowirusowych [9,10].

Wektory lentiwirusowe

Lentiwirusy należą do rodziny retrowirusów, najsławniejszym ich przedstawicielem jest wirus HIV. Ich podstawową zaletą w porównaniu z pozostałymi retrowirusami jest to, że mogą zakażać również komórki niedzielące się. Mogą nieść w sobie insert genowy o wielkości do 8 kb *2+. Znalazły swoje zastosowanie w technikach terapii genowej związanych z wyciszaniem ekspresji genów opartych o siRNA [5]. Wektory oparte na lentiwirusach (najczęściej HIV – 1) mają zalety zbliżone do wektorów retrowirusowych, takie jak łatwość otrzymywania, trwała i stabilna ekspresja wprowadzonego genu, wynikająca z integracji genomu wirusa z genomem gospodarza. Dodatkową bardzo ważną zaletą wektorów lentiwirusowych jest możliwość usunięcia niemal wszystkich naturalnych genów wirusowych oraz sekwencji regulatorowych, co warunkuje wysokie bezpieczeństwo stosowania [4]. Dotychczasowe doświadczenia przeprowadzone na zwierzętach z zastosowaniem wektorów lentiwirusowych zakończyły sie sukcesem, dotyczyły one korekty braków genetycznych oraz zaburzeń fizjologicznych z nimi związanych. Duże nadzieje na wprowadzenie tej metody do terapii genowej człowieka rodzą także przeprowadzone próby przedkliniczne [15].

Wielki potencjał posiada nowa generacja nawa generacja wektorów lentiwirusowych – wektory lentiwirusowe nieintegrujące z genomem (NILV). W założeniach pozwolić one maja na całkowite wykluczenie mutagenezy insercyjnej i związanych z nią konsekwencji. Stworzenie tego typu nośnika informacji genetycznej umożliwiły mutacje w genie integrazy wirusów. Mutacje te powodują dezaktywację integrazy, jednocześnie nie upośledzając ani działania odwrotnej transkryptazy ani transportu kwasów nukleinowych do jądra komórkowego. W ten sposób DNA wektora funkcjonuje w jądrze w postaci episomu, utrzymując ekspresję genu terapeutyczne w tkankach i komórkach niedzielących się, takich jak siatkówka, mózg, czy mięśnie. Wektory NILV pozwalają na korektę mutacji nawet w ludzkich komórkach macierzystych, nie integrując się z genomem i tym samym, wykluczając problem mutagenezy insercyjnej *5+.

Wektory adenowirusowe

Materiał genetyczny adenowirusów występuje w postaci liniowego, dwuniciowego DNA. Należą do najczęściej stosowanych i zarazem najbardziej uniwersalnych nośników wirusowych. Ich zaletą jest łatwość wnikania do większości tkanek, dotyczy to wszystkich typów komórek, zarówno dzielących się, jak i niedzielących, a ich skuteczność in vitro często osiąga 100%. W warunkach naturalnych adenowirusy infekują komórki nabłonkowe układu oddechowego i pokarmowego, to samo powinowactwo wykazują wektory na bazie adenowirusów, a podane do krwioobiegu wprowadzają geny głównie do hepatocytów i komórek śródbłonka wątroby. Nośniki adenowirusowe mają pojemnośd do 8 kb, a w przypadku, gdy usunięte zostaną wszystkie natywne geny wirusa nawet do 30 kb. Ponadto wektory adenowirusowe, jak również same adenowirusy mogą transportować do komórek dużo dłuższe sekwencje DNA, nawet do 170 kb. Dzieje się to na skutek przyłączenia skondensowanego kwasu nukleinowego do otoczki białkowej wirusa za pomocą biotyny, streptawidyny lub polietyloiminy. Taki kompleks wnika do komórki na drodze fagocytozy [2,4]. Wektory adenowirusowe w przeciwieństwie do retrowirusowych, nie maja zdolności wprowadzania DNA do genomu gospodarza. Geny wprowadzone za pomocą tego typu nośników pozostają w jądrze komórkowym w postaci episomalnej, pozwala to na bardzo silną ekspresję, lecz tylko przez okres kilku dni. Po kilku tygodniach obserwuje się całkowity zanik ekspresji transgenu [1,9]. Największą wadą stosowanych dotychczas wektorów adenowirusowych jest ich immunogenność, ok. 90% ludzi ma przeciwciała przeciwko adenowirusom, zatem dostarczenie ich do organizmu powoduje silną reakcję odpornościową i zapalną. Ma to także negatywny wpływ na ekspresję wprowadzonego genu, gdyż silna reakcja cytotoksyczna w stosunku do zainfekowanych komórek powoduje jej wyciszenie. Jednakże uważa się, że przy właściwym dozowaniu ryzyko wystąpienia tak silnej odpowiedzi immunologicznej jest znikome [2,9]. Tak powszechne stosowanie tych nośników informacji genetycznej spowodowane jest szeregiem zalet, jakie wykazują. Należą do nich: dobrze opisany i łatwy do manipulowania genom, stabilność wektorów rekombinowanych, stosunkowo duża wydajność pobierania wektora przez komórki in vivo oraz brak związku z procesem onkogenezy u człowieka i brak dowodów na integrację transgenu z genomem pacjenta. Do tej pory powstały już trzy generacje wektorów adenowirusowych, w każdej kolejnej jest coraz mniej natywnych genów wirusa, a co za tym idzie większe możliwości upakowania genów terapeutycznych i większe bezpieczeństwo stosowania [4].

Prowadzono i ciągle prowadzi się badania mające na celu zmniejszenie ryzyka związanego ze stosowaniem adenowirusów w terapii genowej. Do tej pory najlepszym rozwiązaniem wydaje się być tzw. wektor gutless. Są to adenowirusy pozbawione wszystkich kodujących sekwencji DNA. Zastosowanie ich u myszy z miażdżycą wywołaną brakiem genu apoE zakończyło się sukcesem. Prócz tego, że rozwój choroby został całkowicie zahamowany, to terapia nie wywołała żadnych skutków ubocznych. Nośniki te nie są jednak stosowane w próbach klinicznych z powodu trudności z ich wytworzeniem i możliwość odpowiedzi odpornościowej organizmu na białka kapsydu *10].

Wektory oparte na AAV

Wirusy związane z adenowirusami, inaczej zwane wirusami adenosatelitarnymi, posiadają materiał genetyczny w postaci jednoniciowego DNA. Nie są często stosowane z powodu małej pojemności, która wynosi mniej niż 5 kb DNA, mimo usunięcia z genomu wszystkich sekwencji kodujących (96% całego ich genomu). Mają wiele zalet. Nie ulegają autonomicznej replikacji i nie są patogenne, nie wywołują także odpowiedzi immunologicznej organizmu biorcy [2,4]. Wektory AAV mogą one transdukować wiele typów komórek zarówno dzielących się, jak i niedzielących się. Wprowadzany przez nie gen pozostaje w postaci episomalnej lub integruje się z przypadkowymi miejscami w genomie. Dzikie wirusy AAV wbudowują się w ściśle określone miejsce (AAVS1) na chromosomie 19 człowieka. Tej cechy, choć bardzo pożądanej, gdyż eliminuje ryzyko mutagenezy insercyjnej, nie posiadają wektory AAV, gdyż dezaktywuje się ją wraz z usunięciem genu rep z genomu wirusa. Stosowanie tych wektorów pozwala uzyskać długotrwałą ekspresję genów terapeutycznych [9].

Ważną zaletą nośników DNA opartych o AAV jest możliwość zastosowania tego samego serotypu kolejny raz, ma to ogromne znaczenie w leczeniu schorzeń chronicznych *11]. Doświadczenia przeprowadzone z zastosowaniem AAV dają obiecujące wyniki. Długotrwałe efekty uzyskano w leczeniu hemofilii i dystrofii mięśniowej zarówno u myszy, jak i u zwierząt takich jak psy, czy rezusy. Nadzieje na szersze wykorzystanie tej techniki w terapii genowej człowieka budzą także pozytywnie zakończone próby kliniczne np. w leczeniu choroby Parkinsona [10]. Jednakże wektory AAV mają też swoje wady, prócz małej pojemności, istotną defektem tych wektorów jest zależna od typu komórek efektywność transdukcji, np. niski jej poziom obserwowano dla komórek niektórych nowotworów. Zdarza się także, że stosowanie AAV powoduje odpowiedź immunologiczną na produkt wprowadzonego genu, co w znacznym stopniu obniża jego ekspresję *11]. Istotnym ograniczeniem w stosowaniu wektorów AAV w próbach klinicznych jest niska wydajność ich uzyskiwania [9].

Wektory oparte o inne wirusy

Wiele doświadczeń prowadzonych jest obecnie z zastosowaniem wektorów herpetowirusowych, szczególnie wirusa Epsteina – Barr (EBV) i wirusa opryszczki (HSV). Można w nich umieścić insert o długości 30-40 kb. Ważną cechą wektorów herpetowirusowych jest możliwość replikacji w komórkach docelowych, pozwala to na długotrwałą ekspresję wprowadzonego genu, mimo że nie integruje się z genomem. Wektory HSV w większości przypadków stosowane są do transdukcji neuronów, natomiast EBV – limfocytów B *9+. Wektory rekombinowane oparte o HSV są niestety cytotoksyczne i czas ekspresji wprowadzanego genu nie przekracza 4 dni, zatem lepszym rozwiązanie wydawałyby się defektywne wektory HSV, gdyż w ich przypadku produkt taransgenu widoczny jest do 4 miesięcy. Jednakże, zdarza się, że, niezbędne do ich namnożenia, wirusy pomocnicze wywołują efekty neuropatogenne [4].

Wektory w terapii genowej, wykorzystywane najczęściej do testów szczepionek genetycznych, to pokswirusy, pochodzące od wirusa krowianki. Pozwalają na silną episomalną ekspresję transgenu, mają stosunkowo dużą pojemność i nadają się do infekowania wielu typów komórek.

Do wprowadzania obcych kwasów nukleinowych in vitro stosowane są wektory alfawirusowe. Ich genom stanowi jednoniciowe RNA. Podobnie jak pokswirusy, można je stosować do różnych typów komórek, dzielących się i niedzielących. Zapewniają wysoki poziom ekspresji wprowadzanych genów, lecz równocześnie hamują syntezę wielu endogennych białek i mogą być toksyczne dla organizmu [9]. Ze względu na inhibicję translacji białek gospodarza i bardzo dużą efektywność syntezy swoich białek, w zainfekowanej komórce ok. 90% proteomu stanowią białka wirusowe. Jest to bardzo duże ograniczenie dla stosowania tych wektorów w terapii genowej ze względu na to, że komórka zawierająca wektor alfawirusowy umiera po 3 – 4 dniach. Wirusy te jednak mogą znaleźć swoje zastosowanie w produkcji in vitro białek rekombinowanych z komórek ssaków. Ich wysoka produktywność pozwala na uzyskanie ilości białka wystarczającej do badań krystalograficznych [6].

Kolejną grupą wektorów wirusowych, o których warto wspomnieć są wektory bakulowirusowe. Szczególnie często wykorzystywane są w produkcji białek rekombinowanych. Mają szereg zalet, które pozwalają sądzić, że w przyszłości mogą być szeroko stosowane w terapii genowej. Wnikają do komórek na drodze fagocytozy, a ich materiał genetyczny nie integruje się z genomem gospodarza. Nawet podane w dużych ilościach nie powodują efektu toksycznego na organizm, nie ulegają też replikacji w komórkach kręgowców. Stosunkowo łatwo się je otrzymuje, a ich działanie nie ogranicza się jedynie do komórek dzielących się. Wydają się być bardzo bezpiecznymi w stosowaniu nośnikami informacji genetycznej, lecz badania nad nimi, jak nad wszystkimi nowymi potencjalnymi wektorami, mają charakter eksperymentalny i nie rozpoczęto jeszcze prób klinicznych *6,9].

Perspektywy wykorzystania terapii genowej

Mimo wielu lat badań i doświadczeń, terapia genowa do tej pory nie jest komercyjnie dostępna. Obecnie na świece prowadzi się próby kliniczne mające na celu wprowadzenie jej do leczenia, lecz większość metod znajduje się w pierwszej i drugiej fazie prób, które mają na celu testowanie przede wszystkim bezpieczeństwo terapii, natomiast w czwartej fazie jest jedynie 0,1% [17+. Jednakże dowodem na nieustanny rozwój technik terapii genowej i ciągłą modernizację jej środków jest fakt, że jeszcze trzy lata temu nie prowadzono ani jednej próby klinicznej w fazie IV *10].

Obecnie większość prowadzonych badań (64,6%) dotyczy stosowania terapii genowej w leczeniu nowotworów. Inne choroby, dla których próbuje się znaleźć bezpieczną skuteczną metodę leczenia za pomocą genoterapii, są to choroby układu krążenia, dziedziczne choroby jednogenowe, choroby infekcyjne, neurologiczne i kilka innych [17].

Istnieje realne prawdopodobieństwo, że terapia genowa będzie wykorzystywana w leczeniu nowotworów, nie wymaga ono bowiem długiej ekspresji kwasów nukleinowych w komórkach, a główna wada większości wektorów, jaką jest odpowiedź immunologiczna organizmu tutaj jest cechą pożądaną. Ogromnym wyzwaniem jest jednak nieustannie leczenie wrodzonych chorób genetycznych. Wymagają one wysokiego bezpieczeństwa stosowanych preparatów oraz długotrwałej ekspresji genów terapeutycznych. W tym wypadku obiecujące są wektory hybrydowe noszące w sobie zalety rożnych nośników (np. gutless i AAV) oraz takie, które umożliwiają wprowadzenie transgenu w ściśle określone miejsce w genomie pacjenta, np. oparte o transpozony. Transpozony są ruchomymi elementami genomu. Wykorzystywane są do tworzenia organizmów transgenicznych, w których uszkodzony gen zostaje zamieniony na terapeutyczny, na zasadzie „wytnij/wklej”. Odpowiednio zmodyfikowane być może znajdą swoje zastosowanie w terapii genowej człowieka *1]. Dużego potencjału dopatruje się także w wektorach NILV. Z dotychczasowych badań wynika, że cechują się one zarówno skutecznością, jaki bezpieczeństwem, jednakże jak dotąd nie rozpoczęto prób klinicznych z ich udziałem *5,17]. Duże nadzieje budzi także stosowanie transgenów z promotorami regulowanymi, dzięki temu aktywność ekspresji genu można będzie regulować np. przez podwyższony poziom cholesterolu *10].

Nieustannie trwają badania nad udoskonaleniem nośników informacji genetycznej. Niedawno zostały opisane bardzo dobrze rokujące na przyszłość doświadczenia z użyciem zmodyfikowanych genetycznie białek jedwabiu pajęczego. Zostały one zmienione z ten sposób, że wykazywały powinowactwo do chorych komórek organizmu, natomiast do zdrowych nie. Badania przeprowadzone na myszach z komórkami ludzkiego raka piersi wykazały, że kompleksy białko/DNA wprowadzone do organizmu myszy łączyły się wyłącznie z komórkami rakowymi. Materiał genetyczny
został efektywnie wprowadzony do komórek nowotworowych. Komórki te uległy samozniszczeniu bez szkody dla organizmu [8].

Ważnym aspektem terapii genowej, na którym skupiona jest obecnie uwaga wielu grup badawczych, jest blokowanie syntezy wadliwych białek. Najnowszą techniką blokującej terapii genowej jest interferencja RNA, nazywana także potranskrypcyjnym blokowaniem genów. Proces ten występuje naturalnie w komórkach, jako system ochrony przed wirusami. Technika ta polega na łączeniu się małe cząsteczek siRNA z docelowym mRNA, co powoduje jego degradacje i jednocześnie uniemożliwia przeprowadzenie procesu translacji genu. Dzięki temu możliwe jest selektywne wyciszanie genów, których produkty białkowe biorą udział w procesach prowadzących do różnego typu patologii lub powstawania komórek nowotworowych. Obecnie w tej technice upatrywane są szanse na leczenie chorób o podłożu autoimmunologicznym. Doświadczenia dotyczą blokowania ekspresji biorących udział w inicjowaniu procesów zapalnych i neutralizowania ich receptorów [1].

Podsumowanie

Terapia genowa jest nadzieją na wyleczenie wielu chorób ludzkich, uważanych dziś za nieuleczalne. Idealna terapia powinna być bezpieczna a za razem skuteczna. Inne pożądane cechy to łatwość stosowania i niewielka cena. Całkowite wyeliminowanie efektów ubocznych wydaje się nie byd możliwe do zrealizowania, jednakże obecnie celem badań wielu lekarzy i biotechnologów jest udoskonalenie metod transferu materiału genetycznego do komórek pacjentów do tego stopnia, by stało się to bezpieczne przynajmniej tak samo jak konwencjonalne metody leczenia. Mimo wielu lat badao i wielu przeprowadzonych do tej pory prób przedklinicznych i klinicznych terapia genowa nie jest stosowana komercyjnie.
Rozwój inżynierii genetycznej, badania nad nowymi wektorami kwasów nukleinowych, nad poprawieniem ich efektywności i bezpieczeństwa pozwalają sądzić, że być może w nadchodzących latach terapia genowa stanie się szeroko dostępną, bezpieczną i skuteczną formą leczenia przynajmniej części chorób, stanowiąc uzupełnienie dla metod konwencjonalnych.

Autor: Magdalena Maniecka

Literatura:

1. Baraoska M, Skrętkowicz J. 2007. Perspektywy terapii genowej. Wiadomości Lekarskie 7-8:305-311
2. Bartnik E. 2006. Terapia genowa – obietnice i rzeczywistość. Biologia w szkole 3:12-16
3. Braciszewski J, Markiewicz WT. Kwasy nukleinowe. Kod genetyczny. http://fundacjarozwojunauki.pl
4. Duniec K. 2004. Wirusowe nośniki genów w neurobiologii. Konferencja „Nowe metody w neurobiologii" Warszawa, 13-17
5. Escors D, Breckpot K. 2010. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis 58:107-119
6. http://www.genetherapyreview.com
7. http://www.genetics.edu.au
8. http://www.sciencedaily.com
9. Józefowicz A, Dulak J. 2007. Nowe strategie wykorzystania wektorów plazmidowych i wirusowych w terapii genowej. Biotechnologia 78:7-21
10. Józkowicz A, Dulak J, Szala S. 2008. Obietnica na przyszłośd. Academia 13:4-7
11. Kamieniarz K, Goździcka-Józefiak A. 2005. Zastosowanie AAV jako wektorów w terapii genowej. Biotechnologia 68:79-94
12. Kotulska M. 2007. Perspektywy terapii genowej wspomaganej elektroporacja o kontrolowanym rozmiarze i czasie życia elektropora. XV Krajowa Konferencja Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna, Wrocław
13. Małecki M, Janik P. 2004. Terapia genowa w klinice. Współczesna Onkologia 3:119-123
14. Małecki M. 2004. Preparaty plazmidowe w terapii genowej. Współczesna Onkologia 7:321-327
15. Pluta K, Kacprzak MM. 2009. Use of HIV as a gene transfer vector. Acta Biochimica Polonica 4:531-595
16. Podolska K. 2008. Podstawy terapii genowej (terapia genowa). www.biotechnolog.pl
17. www.wiley.co.uk/genmed/clinical

https://laboratoria.net/artykul/12555.html
Informacje dnia: Resort nauki chce wprowadzić parytety i feminatywy Czeski historyk wyróżniony Nagrodą im. Wacława Felczaka i Henryka Wereszyckiego Użyteczne związki organiczne z gazów cieplarnianych Nie zmiana stanu skupienia śniegu Wodór z wody i światła Smartfony ograniczają zainteresowanie uczniów nauką Resort nauki chce wprowadzić parytety i feminatywy Czeski historyk wyróżniony Nagrodą im. Wacława Felczaka i Henryka Wereszyckiego Użyteczne związki organiczne

z gazów cieplarnianych Nie zmiana stanu skupienia śniegu Wodór z wody i światła Smartfony ograniczają zainteresowanie uczniów nauką Resort nauki chce wprowadzić parytety i feminatywy Czeski historyk wyróżniony Nagrodą im. Wacława Felczaka i Henryka Wereszyckiego Użyteczne związki organiczne z gazów cieplarnianych Nie zmiana stanu skupienia śniegu Wodór z wody i światła Smartfony ograniczają zainteresowanie uczniów nauką

Partnerzy