

Terapia genowa

Jacek Jura

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt

Instytut Zootechniki

Balice k. Krakowa

Jedną z najdłużej nie wyjaśnionych tajemnic pozostawał mechanizm przekazywania informacji dziedzicznej (genetycznej), przez organizmy żywe na pokolenia. Przez wiele wieków prawidłowa odpowiedź na to pytanie przekraczała możliwości jakimi dysponował człowiek. W próbach odpowiedzi, człowiek posługiwał się spekulacjami i mistycyzmem.

Historia ostatnich dwóch wieków przyzwyczaiła nas do tego, że w każdym z nich miała miejsce rewolucja naukowa, zwłaszcza w naukach biologicznych. W ich wyniku, wiele nie wyjaśnionych zagadek zostało rozwiązanych. Co prawda, stan wiedzy w XIX stuleciu nie pozwalał na zbyt głębokie wniknięcie w istotę mechanizmu przekazywania informacji genetycznej, stworzone zostały jednak podwaliny, które umożliwiły w następnym stuleciu rozwiązanie tego problemu. Podstawy stworzył w 1866 r. Johann Gregor Mendel, biolog czeski, formułując prawa dziedziczenia, ale za początek nauki o dziedziczeniu przyjmuje się rok 1900, kiedy to prawie zapomniane wyniki prac Mendla zostały potwierdzone przez Corrensa, Tschermaka i de Vriesa. W 1905 r. W. Bateson wprowadził termin: genetyka (gr. *genetes* = rodzic, zrodzony), a w 1909 r. W.L. Johannsen, po raz pierwszy, użył określenia **gen** dla opisanie podstawowej jednostki substancji dziedzicznej zlokalizowanej w chromosomie lub w cytoplazmie (gr. *genos* = pochodzenie) (1). Mechanizm funkcjonowania genu i jego budowa zostały jednak poznane dopiero pół wieku później, po odkryciu w 1953 r. przez Watsona i Cricka struktury kwasu deoksyrybonukleinowego i opisanie procesu jego replikacji.

Dzisiaj dysponujemy nie tylko wiedzą, jak są zbudowane geny, jak funkcjonują, za co odpowiadają. Dysponujemy prawie kompletnymi mapami genomów człowieka, niektórych drobnoustrojów i zwierząt, a do końca naszego stulecia będziemy dysponować ich pełnymi wersjami. Posiadamy również wiedzę o tym, że to właśnie geny odpowiadają za „zaprogramowaną” śmierć komórek, niektóre wady rozwojowe narządów i szereg nękających populację ludzką chorób dziedzicznych. Co więcej, wiemy jakie geny, za jakie cechy odpowiadają i potrafimy je modyfikować, naprawiać, blokować. Co ciekawsze, do procesu naprawy „błędów natury” zaprzęgnięto organizmy (retro- i adenowirusy), których naturalną funkcją jest działanie na szkodę zaatakowanego organizmu, właśnie poprzez modyfikacje istniejących w nich genów.

Z każdym niemal dniem nasza wiedza na temat dziedziczenia jest wzbogacona o nowe informacje.

Wszystkie te informacje zawdzięczamy rewolucji, która dokonała się w ostatnich 15 latach w naukach biologicznych, jakiej jesteśmy świadkami na co dzień. Rewolucję tę określono mianem rewolucji biotechnologicznej. W jej wyniku opracowano szereg złożonych metod umożliwiających przenoszenie informacji genetycznej pomiędzy komórkami, pomiędzy organizmami pro- i eukariotycznymi. Możliwości te, głównie za sprawą działu biotechnologii — dynamicznie rozwijającej się inżynierii genetycznej, pozwoliły na opracowanie metod leczenia schorzeń wywoływanych przez nieprawidłowo funkcjonujące geny — stosowanie terapii genowej. W ostatnich pięciu latach, tylko w Stanach Zjednoczonych opracowano ponad 100 oficjalnie zarejestrowanych protokołów terapii genowych, z których część z powodzeniem została już zastosowana (2-6).

Spośród wielu chorób, które nas nękają, ponad 4 tysiące zostało rozpoznanych jako genetyczne. Mają one podłoże w nieprawidłowym funkcjonowaniu pojedynczego genu lub zespołu genów (2,7,8). Najskuteczniejszym sposobem leczenia chorych genów jest możliwość ich naprawy poprzez wstawienie do materiału dziedzicznego „protezy”, tzn. zastąpienie nieprawidłowych genów prawidłowymi.

Terapia genowa składa się z szeregu złożonych metod biotechnologicznych umożliwiających leczenie poprzez naprawę, zamianę lub zablokowanie funkcji pojedynczego genu, odpowiedzialnego za wystąpienie danej jednostki chorobowej.

Terapia genowa może dotyczyć komórek rozrodczych (płciowych), zygoty przed pierwszym podziałem lub komórek ciała (komórek somatycznych). Zastosowanie terapii genowej do komórek rozrodczych może spowodować, że wprowadzone zmiany w kodzie genetycznym zostaną przekazane potomstwu i w tym zakresie zabiegi wykonywane są tylko na zwierzętach. Zabiegi na komórkach rozrodczych człowieka, zarówno ze względu na ich złożoność, nieprzewidywalność skutków w odniesieniu do potomstwa (możliwość wystąpienia nieprawidłowości w funkcjonowaniu zmienionego genomu lub na skutek nieprawidłowego zintegrowania się z obcym genem), jak i ze względów etycznych, nie powinny być wykonywane. Zabiegi przeprowadzane na komórkach somatycznych, mogą dotyczyć korygowania zarówno defektów genetycznych, jak i niegenetycznych. Postępowanie może dotyczyć komórek, tkanek lub narządów nieprawidłowo funkcjonujących jedynie u danego osobnika poddanego terapii. Terapię somatyczną można przeprowadzać dwoma sposobami: *ex vivo* lub *in vivo* (9-11).

Metoda *ex vivo* polega na wyodrębnieniu docelowych komórek organizmu dotkniętego chorobą, modyfikacji genetycznej metodami *in vitro* i powtórnym wprowadzeniu ich do organizmu tego samego chorego (9-11). Dotychczas najlepiej opanowaną metodą jest wykorzystanie w terapii genowej pierwotnych (twórczych) komórek krwi, wyizolowanych ze szpiku kostnego, w leczeniu chorób związanych z brakiem odporności (2,11). Zmodyfikowane pierwotne komórki krwi, wprowadzone z powrotem do organizmu, produkują

pokolenia zmodyfikowanych, prawidłowo funkcjonujących komórek krwi, które zastępują w organizmie komórki nieprawidłowe (2,11,12). Postępowanie takie po raz pierwszy zastosowano w 1991 r. u grupy dzieci chorych na bardzo rzadki, złożony zespół niedoboru odporności (SCID, ang. *severe combined immunodeficiency disease*) spowodowany brakiem enzymu deaminazy adenozyminy (ADA, ang. *adenosine deaminase enzyme*) (2,9,11,12). Do organizmu chorych wprowadzono wcześniej od nich pobrane i zmodyfikowane laboratoryjnie komórki krwi, wyposażone w gen ADA odpowiedzialny za produkcję enzymu ADA. Uzyskano odporność na antygeny, normalizację krążących w krwi limfocytów i pojawienie się przeciwciał (2,9,11,12).

Terapię genową *ex vivo* stosuje się też w leczeniu nowotworów. Polega ona na pobraniu z nowotworu komórek, wyposażeniu ich w gen odpowiedzialny za produkcję, np. czynnika martwicy nowotworów TNF (ang. *tumour necrosis factor*) czy interleukinę (IL-2, IL-4) i ponownym wprowadzeniu zmodyfikowanych komórek do tkanki nowotworowej (9,13-15). Takie postępowanie powoduje niekiedy znaczne zmniejszenie się nowotworu, a nawet zatrzymanie jego rozwoju na skutek namnożenia się działających nekrotycznie wprowadzonych komórek. Szczególnym rodzajem terapii genowej *ex vivo* jest autolimfocytowa terapia komórkowa (ALT, ang. *autolymphocyte cell therapy*) (11,16,17). Metoda ta polega na pobraniu od chorego limfocytów i traktowaniu ich w hodowli pozaustrojowej cytokinami. **Cytokiny to substancje wydzielane przez limfocyty T-pomocnicze, stymulujące zarówno odpowiedź humoralną, jak i komórkową** (9-11). Wprowadzone z powrotem do krwiobiegu pacjenta limfocyty po traktowaniu cytokinami zwalczają powstały nowotwór.

Terapia genowa *in vivo* polega na wprowadzaniu genów prawidłowych wprost do nieprawidłowo funkcjonujących komórek, tkanek lub narządów organizmu chorego.

Zasadniczą trudnością w procesach terapii genowej zarówno *ex vivo*, jak i *in vivo* jest, znalezienie niezawodnego, powtarzalnego, stabilnego i wydajnego sposobu wprowadzania DNA do komórek (w organizmie lub w hodowli pozaustrojowej) (2). Stosuje się kilka technik, które znalazły wcześniej zastosowanie przy wprowadzaniu DNA do komórek w hodowli pozaustrojowej oraz w procesach uzyskiwania transgenicznych roślin i zwierząt. Najczęściej stosowanym sposobem wprowadzania DNA do chorych komórek jest posługiwanie się zrekombinowanymi retrowirusami (2,11).

Terminem transfekcja określa się wprowadzenie odcinka DNA do komórki za pomocą zrekombinowanego wirusa, tzn. takiego, którego część genomu stanowi zmodyfikowany laboratoryjnie odcinek RNA lub DNA. Termin jest stosowany również jako określenie żargonowe, oznaczające wprowadzenie egzogenego DNA do komórek ssaków lub roślin (np. z zastosowaniem elektroporacji lub mikroiniekcji).

Retrowirusy zbudowane są z pojedynczej nici RNA. Retrowirusy wnikając do komórek wprowadzają do nich RNA, kopiują DNA na matrycy RNA, które trafia do danego chromosomu komórki. Można je zatem wykorzystywać jako nośniki (wektory) przenoszące żadaną informację genetyczną do chorych ko-

mórek w organizmie pacjenta (2,9). Przy tym sposobie istnieje jednak ryzyko wprowadzenia obcego, niepożądanego DNA do genomu komórek chorego (np. zmutowanego w czasie rekombinacji, lub źle „oczyszczonego”, zawierającego patogenne fragmenty genomu wirusa) (2,8). Ograniczeniem tej metody (zastosowania retrowirusów jako wektorów zrekombinowanej informacji genetycznej) jest i to, że ekspresja tak wprowadzonego DNA następuje tylko w komórkach będących w trakcie podziałów (2). Ponadto, proces integracji wprowadzanego DNA najczęściej następuje w zupełnie przypadkowym miejscu, co może prowadzić do zaburzenia lub uszkodzenia genu regulatorowego, a w efekcie doprowadzić do sprowokowania zmian nowotworowych (1,4). Wreszcie, wektory retrowirusowe nie mogą być ukierunkowane na specyficzne typy komórek (nie infekują wybiórczo) i są niestabilne *in vivo*, w komórkach ssaków naczelnych (2,4).

Wektory adenowirusowe należą do grupy nośników, które mają zdolność infekowania (podobnie jak wektory retrowirusowe) wielu typów komórek, z tą różnicą, że są to komórki nie będące w trakcie podziału. Nośniki te są bardziej stabilne *in vivo* i mogą być z powodzeniem stosowane do transfekcji komórek *in situ*. Adenowirusy zbudowane są z dwuniciowego DNA. Nośniki te były wykorzystywane z powodzeniem do transfekcji komórek wątroby (wprowadzanie genów czynnika VIII i IX, których brak wywołuje hemofilię typu A lub B) oraz do wprowadzenia genu CFTR (ang. *cystic fibrosis resistant gene*) do komórek nabłonka dróg oddechowych, w leczeniu zwiłknienia cystowego (2,4,11). Niedogodnością w stosowaniu wektorów adenowirusowych jest to, że nie ulegają one integracji z DNA jądrowym, a wprowadzane geny mogą ulec ekspresji jedynie z DNA episomatycznego. Często jednak, nawet w nie dzielących się komórkach, episomy ulegają dezaktywacji lub w trakcie następującego podziału komórki są trawione albo wydalane. W związku z tym wektory adenowirusowe nie nadają się do transfekcji komórek pierwotnych (ang. *stem cells*) (2). Kolejnym ograniczeniem w zastosowaniu wektorów adenowirusowych jest to, że w wielu przypadkach działają immunogennie, tzn. komórki, które zostały przez nie transfekowane, są niemal natychmiast atakowane przez przeciwciała i niszczone. Prowadzi to do natychmiastowego obniżenia lub całkowitego wyeliminowania produktów powstałych na bazie wprowadzonego genu (2,4,11). Ponowna transfekcja komórek z zastosowaniem wektora adenowirusowego wzmaga odpowiedź immunologiczną organizmu, w skrajnym przypadku doprowadzając do trwałego wyeliminowania komórek zawierających wprowadzony wektor (2,4,9).

Innym sposobem, wykorzystywanym w terapii genowej, jest wprowadzanie fragmentów DNA na drodze biobalistyki.

Biobalistyka jest techniką wprowadzania egzogennej informacji genetycznej do wnętrza komórek (zwłaszcza roślinnych), polegającą na wstrzeliwaniu mikrokulek z metali szlachetnych lub polimerowych opłaszczonych zrekombinowanym DNA z zastosowaniem tzw. dział biobalistycznych. Są one precyzyjnymi urządzeniami wykorzystującymi ładunek pirotechniczny lub efekt eksplozji kropli wody, poddanej krótkiemu wyładowaniu elektrycznemu, do wystrzelenia mikrokulki opłaszczonej

DNA. W najnowocześniejszych urządzeniach tego typu miejsce wstrzelenia jest sterowane światłem lasera. Technika biobalistyczna została opracowana w Cornell University, USA, a skomercjalizowana przez korporację DuPont (9).

Technika pozwala na wprowadzenie DNA w krótkim czasie do dużej liczby komórek lub ich organelli (np. do mitochondrium). Wstrzelone DNA ulega dyfuzji i łączy się z chromosomami. Technika jest szeroko stosowana do transformacji komórek w hodowlach *in vitro* (hodowle stacjonarne — komórki przytwierdzone do podłoża), zwłaszcza w procesie produkowania transgenicznych roślin. Niedoskonałością metody jest stosunkowo niski stopień integracji wprowadzanego DNA. W badaniach nad terapią genową technikę wstrzeliwania mikrokulek opłaszczonych DNA zastosowano do transfekcji komórek skóry u myszy. Tak wprowadzone DNA było jednak aktywne jedynie przez kilka dni (9).

Kolejną metodą wykorzystywaną w terapii genowej jest bezpośrednio wstrzykiwanie roztworu zawierającego liczne fragmenty DNA, zawieszony w roztworze fosforanu wapnia, bezpośrednio do zmienionej chorobowo tkanki narządu (np. wątroby lub mięśni) (11). Po wprowadzeniu buforu z zawiesiną DNA u części komórek dochodzi do zintegrowania nowego DNA, co niekiedy pozwala na uzyskanie miejscowej ekspresji wprowadzonego genu. Metoda ta okazała się pomocna, np. w zwalczaniu dystrofii mięśni (11).

Bezpośrednie wstrzykiwanie do niektórych tkanek narządów wewnętrznych (głównie wątroby, w mniejszym stopniu trzustki) DNA enkapsulowanego przez liposomy, jak się okazało, jest również skuteczne. **Liposom to mikroskopijnej wielkości kapsuła lipidowa. Powstaje w wyniku zamknięcia błony lipidowej utworzonej przez spolaryzowane hydrofilowe i niespolaryzowane hydrofobowe cząsteczki lipidów w środowisku wodnym** (9). We wnętrzu liposomu można zamykać dowolne wielopeptydy (np. DNA). Warstwa lipidowa stanowi doskonałą warstwę ochronną. Ponadto powierzchnia liposomu może być wykorzystana jako miejsce, do którego przyłączane są przeciwciała. Liposomy są szybko wchłaniane przez komórki, a DNA w nich zawarty ulega ekspresji. Ze względu na te właściwości, liposomy znalazły zastosowanie jako transportery terapeutyków (nie są trawione w żołądku), które są szybko absorbowane w jelitach. Liposomy, z umiejscowionymi na powierzchni przeciwciałami, mogą być wprowadzane do krwiobiegu, gdzie swobodnie docierają do komórek organów docelowych (poddanych terapii) (2,9,10). Jedynym i głównym mankamentem stosowania liposomów w terapii jest ich ograniczona stabilność (czas efektywnego działania jako nośników), dużo mniej niż kapsuł uzyskanych z substancji polimerowych (9).

Terapia genowa jest metodą terapeutyczną coraz wyraźniej podlegającą komercjalizacji, stwarzającą różne problemy biomedyczne, bioetyczne i prawne (wiele proponowanych sposobów terapii genowej budzi wątpliwości co do skuteczności lub kończy się całkowitym niepowodzeniem). Lista chorób genetycznych człowieka, co do których podejmuje się próby terapeutyczne obejmuje: mukowiscydozę, insulinozależną cukrzycę, karłowatość, rozedmę płuc, dziedziczną hipercholesterolemię, homoglobionopatie, hemofilię, zespół Gau-

chera, dystrofię mięśniową, fenyloketonurię. Obejmuje również choroby nabyte: różnego rodzaju choroby nowotworowe, choroby układu krążenia, choroby neurodegeneracyjne, AIDS i artretyzm (11).

Mimo spektakularnych sukcesów, jakie niewątpliwie uzyskano w leczeniu niektórych jednostek chorobowych (genetycznych i nabytych), stosując terapię genową, najpoważniejszym problemem w szerokim zastosowaniu tej metody jest brak uniwersalnego nośnika (wektora), bezpiecznego i zapewniającego wysoką efektywność integracji i ekspresji wprowadzanego DNA.

Pierwsze uregulowania prawne, dotyczące stosowania terapii genowej, powstały w USA w 1990 r. (dotyczyły eksperymentu z SCID). Następnie ustalono spis instytucji rządowych, które mają prawo podjęcia decyzji o rozpoczęciu lub przerwaniu eksperymentów. Należą do nich: National Institute of Health (NIH), National Cancer Institute (NCI), Food and Drug Administration (FDA) (5,9). W krajach europejskich tworzy się dopiero odpowiednie akty prawne, regulujące nie tylko stosowanie terapii genowej, ale również tworzone są instytucje odpowiedzialne za nadzorowanie prac związanych z szeroko pojętą biotechnologią (5).

Pomijając wszelkie kontrowersje, jakie budzić może terapia genowa, niezaprzeczalnym pozostaje fakt, że to właśnie ona jest jednym z największych osiągnięć współczesnej nauki, stojącej u progu nowego tysiąclecia.

Literatura

1. Jura Cz., Krzanowska H., (1992), *Leksykon biologiczny*, WP, Warszawa.
2. Afione S. A., Conrad C. K., Flotte T. R., (1995), *Clinical Pharmacokinetics*, 28 (3), 181-189.
3. Alton E. W. F. W., Geddes D. M., (1995), *Thorax*, 50, 484-486.
4. Becker Y., Darai G., (1995), *Journal of Molecular Medicine*, 73, 103-105.
5. Cohen-Haguenaer O., (1995), *European Journal of Cancer*, 30A (8), 1193-1200.
6. Editorial comentary, (1995), *The Lancet*, 345 (8952), 739-740.
7. Coutelle C., Douar A-M., Colledge W. H., Froster U., (1995), *Nature Medicine*, 1 (9), 864-866.
8. Dube I. D., Cournoyer D., (1995), *Can. Med. Assoc. J.*, 152 (10), 1605-1613.
9. Bains W., (1994), *Biotechnology from A to Z*, Oxford University Press Inc., New York.
10. Brenner M. K., (1995), *Journal of Internal Medicine*, 237, 229-239.
11. Węgleński P., (1995), *Genetyka molekularna*, pr. zb., PWN, Warszawa.
12. Hanania E. G., Kavanagh J., Hortobagyi G., Giles R. E., Champlin R., Diesseroth A. B., (1995), *The American Journal of Medicine* 99, 537-552.
13. Bronte V., (1995), *Cancer*, 76 (10), 1878-1881.
14. Eades-Perner A-M., Zimmermann W., (1995), *Tumor Biol.*, 16, 56-61.
15. Stewart F. M., (1995), *Journal of Cellular Biochemistry*, 58, 416-423.
16. Ledley F. D., (1995), *Human Gene Therapy*, 6, 1129-1144.
17. Williams S. R., (1995), *Nature Medicine*, 1 (11), 1137-1138.

Gene therapy

Summary

Human gene therapy is one of the methods of the new millennium. There are over 100 protocols of gene therapy accepted by ethics committees and applied successfully in clinics.

Key words:

gene therapy, gene vectors, delivery methods.

Adres do korespondencji:

Jacek Jura, Zakład Fizjologii Rozrodu, Instytut Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa; e-mail: jjura@izoo.krakow.pl