



Zastosowanie AAV jako wektorów w terapii genowej

Kinga Kamieniarz, Anna Goździcka-Józefiak

Zakład Wirusologii Molekularnej, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Adeno-associated virus vectors in gene therapy

Summary

The development of targeted vectors, capable of tissue-specific transduction, remains one of the most important aims of vector modification for gene therapy applications. The gaining popularity of recombinant vectors based on adeno-associated viruses (rAAV) in gene therapy can be attributed to their lack of pathogenicity, added safety due to their replication defectiveness, relatively low immunogenicity and their ability to mediate long-term expression in a variety of tissues. The major shortcoming of these vectors is their small packaging capacity. AAV vectors have already broad utility in the therapy of many diseases, including neurological disorders and various types of cancer. Moreover, they can also serve as transfer vehicles for DNA vaccines.

Key words:

AAV, adeno-associated virus, dependovirus, gene therapy, vector.

Adres do korespondencji

Kinga Kamieniarz,
Zakład Wirusologii
Molekularnej,
Instytut Biologii
Molekularnej
i Biotechnologii,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Międzychodzka 5,
60-371 Poznań.

1. Wstęp

Celem współczesnej medycyny jest zrozumienie źródeł schorzenia i zwalczenie jego przyczyn, w przeciwieństwie do tradycyjnego łagodzenia objawów. Wielki postęp w biologii i genetyce molekularnej dokonany w minionych dwudziestu latach umożliwia izolację, klonowanie i sekwencjonowanie genów, jak również dokładne poznanie genetycznych przyczyn chorób. Dzięki temu pojawiła się możliwość zastosowania tzw. terapii genowej, polegającej na naprawie lub zastąpieniu wadliwie funkcjonującego genu. Jedną z przeszkód w rozwoju terapii genowej stanowi

konieczność znalezienia odpowiedniego wektora skutecznie wprowadzającego geny do komórek docelowych i nie powodującego skutków ubocznych. W większości przypadków wektorami stają się pochodne wirusów, które rozwinęły wydajny system przenoszenia swoich genów do komórek człowieka. Z takiego wektora usuwa się geny warunkujące proces chorobotwórczy, natomiast wprowadza gen wraz z sekwencjami promotorowymi i regulującymi jego ekspresję. Niekiedy zrekombinowaną cząsteczkę DNA „pakuje” się tylko w płaszcz wirusowy, co umożliwia jej przeniknięcie do odpowiednich komórek człowieka. W ostatnich latach dużym zainteresowaniem jako potencjalne wektory do terapii genowej cieszą się wirusy zależne od adenowirusów – AAV (ang. *adeno-associated viruses*).

2. Ogólna charakterystyka parwowirusów

Dependowirusy, zwane też AAV należą do rodziny Parvoviridae, podrodziny Parvovirinae (tab.). Ich cykl replikacyjny jest zależny od wirusa wspomagającego, którym jest adenowirus lub wirus herpes.

Tabela

Systematyka parwowirusów (wg 1)

Rodzina	Parvoviridae	
podrodzina	Parvovirinae (występuje u kręgowców)	Densovirinae (występuje u bezkręgowców)
rodzaje	Parvovirus Erythrovirus <i>Dependovirus</i>	Densovirus Icteravirus Contravirus

Parwowirusy są jednymi z najmniejszych znanych wirusów (łac. *parvus*: mały). Ich wirion nie posiada osłonki, ma symetrię ikosaedrałną i średnicę od 18 do 26 nm. Materiałem genetycznym wirusa jest jednociowy DNA o polarności dodatniej lub ujemnej, zbudowany z około 4 tysięcy zasad. Autonomiczne parwowirusy replikują się w jądrze komórkowym, gdy komórka jest w fazie intensywnej syntezy (fazie S), a AAV wymagają do swojego powielania wirusa pomocniczego.

Genomy wszystkich parwowirusów autonomicznych zawierają na końcach 3' i 5' specyficzne sekwencje końcowe. Odcinki te są bogate w pary GC i mają zdolność tworzenia struktury spinki do włosów. Struktura spinki do włosów na końcu 3' przyjmuje kształt litery Y lub T i jest istotna w procesie replikacji DNA.

W odróżnieniu od autonomicznych parwowirusów, genom AAV posiada 145 nukleotydowe końcowe powtórzenia sekwencji o odwróconej polarności. Pierwsze 125 zasad zaangażowane jest w tworzenie struktury w kształcie litery Y lub T prawie identycznej ze strukturą na końcu 3' DNA parwowirusów autonomicznych.

(i związanego z nim AAV6) nie jest jasne. Istnieją również doniesienia o wyizolowaniu dwóch nowych typów AAV (AAV7 i 8). Każdy z serotypów AAV ma odmienne właściwości jeśli chodzi o zdolność do infekcji komórek określonej tkanki, co ma decydujące znaczenie w konstrukcji wektorów (2-4).

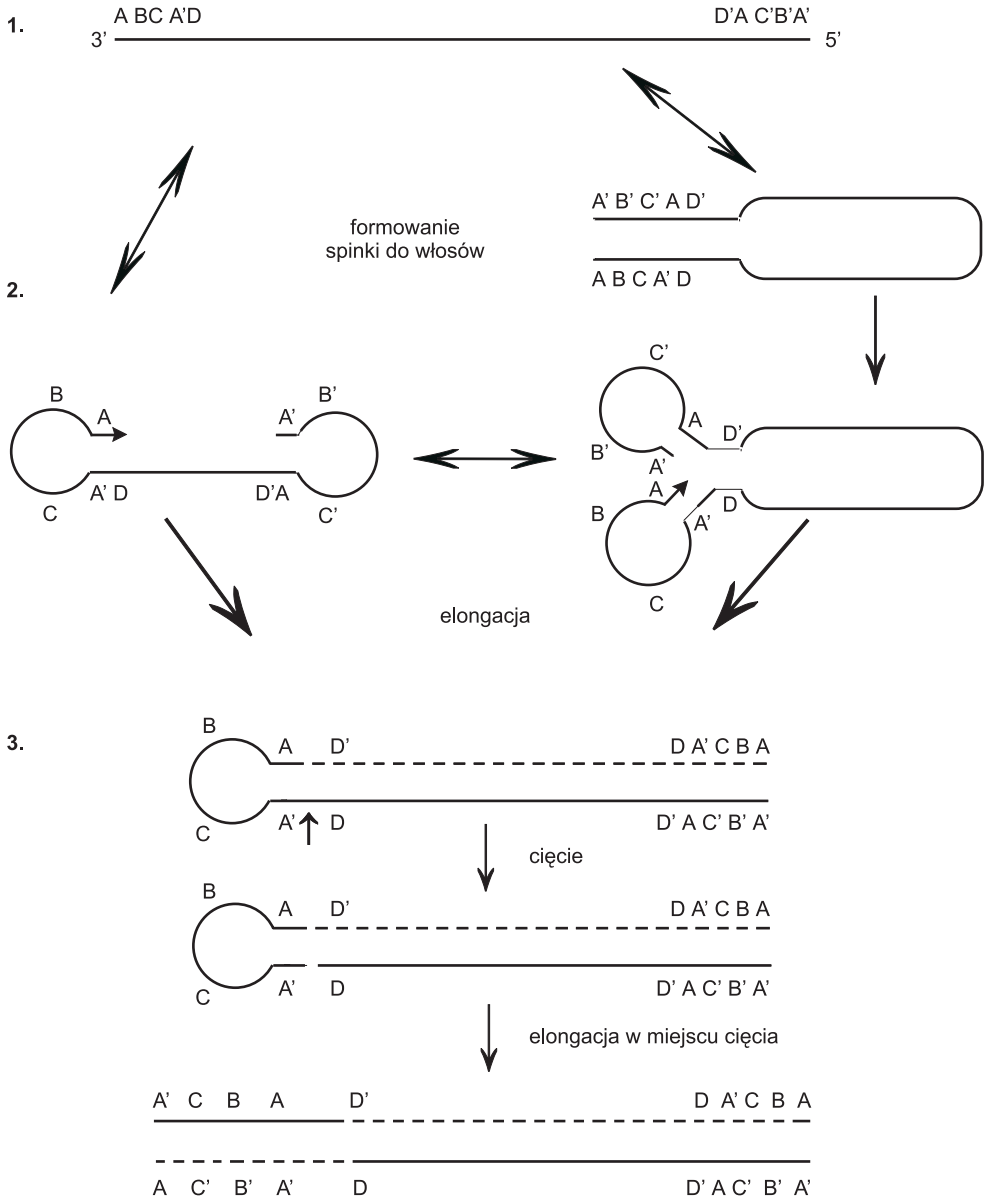
3.1. Genom dependowirusów

DNA AAV, podobnie jak autonomicznych parwowirusów, zawiera dwie duże otwarte ramki odczytu- CAP i REP, kodujące odpowiednio białka strukturalne i nie-strukturalne (patrz wyżej). Ze względu na wyjątkowo mały rozmiar ich genomu, produkty białkowe obu ORF pełnią kilka funkcji. Tak też REP koduje co najmniej cztery białka, których sekwencje nakładają się, podczas gdy CAP co najmniej trzy. Białka Rep pełnią funkcje regulatorowe w każdej fazie cyklu replikacyjnego AAV. Pod nieobecność wirusa wspomagającego, Rep 68/78 hamuje ekspresję genów AAV i replikację DNA, zdaje się też odgrywać ważną rolę w procesie integracji wirusowego genomu do genomu gospodarza i wytworzenia stanu utajenia. Z kolei w obecności wirusa pomocniczego Rep 68/78 jest transaktywatorem ekspresji wirusowych genów, potrzebny jest też do replikacji DNA oraz uwolnienia wirusowego genomu z DNA komórkowego.

Zarówno do replikacji, jak i transkrypcji wirusowego DNA niezbędne są końcowe powtórzenia sekwencji o odwróconej polarność. Rejony te odgrywają także ważną rolę podczas opłaszczania wirusowego DNA i integracji do genomu komórkowego.

Wówczas gdy nie dochodzi do koinfekcji wirusem pomocniczym i brak jest jego czynników białkowych, ekspresji ulega jedynie gen REP. Jego produkty są odpowiedzialne za hamowanie ekspresji genów z niektórych promotorów heterologicznych oraz co najmniej jednego, jeśli nie wszystkich promotorów własnych.

Replikacja parwowirusowego DNA zachodzi w jądrze komórkowym. W procesie tym udział bierze komórkowa polimeraza DNA- α lub δ . Jako starter w replikacji służy grupa OH na końcu 3' w strukturze spinki do włosów wirusowego DNA. Nie ma dowodów na obecność starterów typu RNA ani fragmentów Okazaki. Jedna z nici powstałego dsDNA jest przecinana przez białko Rep 68/78, następuje denaturacja nici DNA na końcu 5' i dalsza elongacja (rys. 2).



Rys. 2. Model replikacji DNA AAV (wg 1);

1) ssDNA AAV, na końcach odwrócone palindromiczne powtórzenia, 2) dwa sposoby parowania końców umożliwiające inicjację replikacji DNA AAV, 3) replikacja.

3.2. Integracja AAV do genomu komórkowego

Pod nieobecność wirusa wspomagającego, AAV penetruje do jądra, gdzie jego genom integrowany jest do komórkowego DNA- powodując stan infekcji utajonej. Aktywacja następuje po zakażeniu komórki wirusem pomocniczym. Wirusowe DNA w genomach większości zainfekowanych komórek występuje w postaci tandemowych powtórzeń odpowiadającym kilku genomom. Do integracji AAV dochodzi w wyniku rekombinacji niehomologicznej w określonym miejscu na chromosomie 19q. W rejonie tym występuje jednak od 4 do 5 zasad homologicznych. Integracji towarzyszą zmiany i inwersje zarówno w sekwencji DNA wirusa jak i komórki, a mimo że jest ona miejscowo specyficzna, w proces ten zaangażowanych jest kilkaset zasad.

Miejsce preintergracji w chromosomie (zbudowane z kilku tysięcy zasad) zawiera sekwencję (GCTC)₃ wiążącą białko Rep. Proteina ta prawdopodobnie bierze udział w ligacji wirusowego DNA z DNA komórkowym. Ta właściwość białka Rep oraz pełnione przez nie funkcje nukleazy i helikazy mogą tłumaczyć mechanizm specyficzności miejsca integracji AAV. Poza tym białko Rep bierze również udział w inicjacji replikacji DNA wirusa.

Czynnikiem decydującym o miejscowo specyficznej integracji AAV, jak się wydaje, jest rozpoznawany rejon, a właściwa rekombinacja zachodzi w miejscu oddalonym od niego o kilkaset par zasad. Struktura chromatyny chromosomu 19q prawdopodobnie nie ma znaczenia dla specyfiki miejsca integracji.

Mechanizm, dzięki któremu genom AAV przechodzi z formy jednoniciowej występującej w wirionie, w dwuniciowy tandemowy stan obserwowany w komórkowym DNA nie jest dobrze poznany.

Nie wiadomo, jakie są konsekwencje utajonej infekcji dla gospodarza (1).

4. AAV jako wektory

4.1. Cechy wektora AAV

AAV cieszą się dużym zainteresowaniem jako potencjalne wektory w terapii genowej. O ich użyteczności decyduje wiele cech.

Zdolność wektorów AAV do infekcji wielu typów komórek różnych gatunków zwierząt, skutecznej ich transdukcji oraz stabilnej ekspresji przenoszonych genów umożliwia szerokie ich stosowanie. Wydajność ekspresji jest jednak zróżnicowana w zależności od komórki i tkanki oraz użytego serotypu wirusa. Wektory te mogą infekować zarówno komórki proliferujące jak i nieproliferujące, nawet postmitotyczne neurony. Szczególnie dobre wyniki uzyskuje się w przypadku komórek mięśni, siatkówki, centralnego układu nerwowego i płuc.

Rosnącą popularność AAV w terapii genowej można też tłumaczyć brakiem ich patogenności oraz defektywnością replikacji, co jest dodatkowym zabezpieczeniem przed rozwojem zakażenia. Bezpieczeństwo można jeszcze zwiększyć, konstruując rekombinowane wektory AAV, integrujące w specyficznym miejscu na chromosomie 19, tak jak ma to miejsce u dzikich AAV. Kolejnymi zaletami wektorów AAV jest stosunkowo niska immunogenność oraz to, że mogą one nie zawierać żadnych wirusowych genów.

Ekspresja transgenu po transdukcji AAV zachodzi z pewnym opóźnieniem, ale za to jest długotrwała, nawet 18-miesięczna (porównywano do Ad, HSV-1, retrowirusa). Ważną właściwością jest też możliwość ponownego podania tego samego serotypu po pewnym czasie od pierwszej terapii genowej (w zależności od tkanki i transportowanego genu- od kilku tygodni do kilku miesięcy), co ma szczególne znaczenie w przypadku leczenia schorzeń chronicznych. Limit wielkości obcego DNA, który można wklonować do wirionu AAV to około 4 do 4,5 tysięcy zasad (2,6-22).

4.2. Wirusowe elementy sekwencji niezbędne do replikacji zmodyfikowanego AAV zawierającego transgen

Elementami, które wpływają na poziom ekspresji transgenu wprowadzonego przez wektor utworzony na bazie AAV są: końcowe powtórzenia w genomie AAV oraz wirusowe białka Rep. Obecność końcowych powtórzeń znacznie zwiększa skuteczność ekspresji transgenu. Chociaż produkty genu Rep są potrzebne do uprzywilejowanej integracji, insercja tego genu może zmniejszać poziom ekspresji transgenu, np. w komórkach glejaka, co powodowane jest przypuszczalnie ich cytotoksycznym działaniem (17,19,20,23).

4.3. Modyfikacje wektora

Początkowo skonstruowano dwa główne typy wektorów. W pierwszym z nich wycięto gen kapsydu i zastąpiono go obcym DNA. Ten typ wektora zachowuje gen Rep i może integrować się w specyficznym dla AAV miejscu na chromosomie 19q. W drugim typie wektora do obu końców obcego DNA dodaje się typowe dla AAV końcowe powtórzenia o odwróconej polarności. W niektórych przypadkach taki wektor może integrować do genomu gospodarza i transformować z częstością powyżej 50%, ale znacząco zredukowana jest specyfika miejsca integracji. Obecnie stosuje się wektory na bazie plazmidów, wektory powstające przez włączenie AAV do większego wirusa oraz opłaszczanie *in vitro*. W ten sposób nie tylko można włączyć gen Rep, ale również dostarczyć do komórki większe geny terapeutyczne (20).

W celu zwiększenia użyteczności wektorów, próbuje się także modyfikować ich tropizm do komórek. Stosuje się do tego celu specyficzne przeciwciała, które zwiększają

szają zdolność wektora do wiązania się z komórką oraz neutralizują tropizm wirusa dzikiego. Innym sposobem jest zmodyfikowanie wirusowego kapsydu tak, żeby zawierał ligandy, rozpoznawane przez wybrane receptory. Często stosowaną metodą jest opłaszczenie genomu AAV jednego serotypu kapsydem należącym do innego serotypu. Przykładem jest AAV2, który daje niezwykle trwałą ekspresję transgenów, ale poziom infekcji jest niski z powodu trudności z penetracją tego wirusa do komórki. Wektor złożony z genomu AAV2 w kapsydzie AAV5 (AAV2/5), dzięki zdolności wnikania do komórki przez inne receptory, pozwala na skuteczną transdukcję komórek wielu tkanek (2,5,15,19,24,25).

Aby zwiększyć pojemność wektora, do ekspresji genu próbuje się wykorzystać dwa niezależne wektory AAV. Dotychczas skuteczność tej metody była niewielka, zależna od wyboru właściwego serotypu AAV, a jej przydatność dla zastosowań medycznych ograniczona. Jednak w mięśniach szkieletowych efektywność uzyskanej w ten sposób ekspresji transgenów była podobna do ekspresji nienaruszonego transgenów dostarczanego przy użyciu wektorów AAV2 umieszczonych w kapsydach AAV5 (AAV2/5) (5).

W celu polepszenia wydajności transdukcji, do wektorów AAV przenoszących określony gen dodaje się promotor innych wirusów, np. cytomegalowirusa (CMV), RSV (*rous sarcoma virus*), SV40 (*simian virus*) lub elementy specyficznie zwiększające ekspresję genu w danej tkance takie jak: CK6¹ i MCK² w mięśniach, czy CC10³ w płucach (10,15,26,27).

Genom wirusa AAV jest także wykorzystywany do tworzenia wektorów hybrydowych. Przykładem jest hybrydowy wektor AAV/Ad. Jego zaletą jest połączenie w jednej cząstce cech wektorów adenowirusowych (Ad)- dużej pojemności oraz skutecznego dostarczania genu niezależnie od cyklu komórkowego, z cennymi właściwościami wektorów AAV- długoterminową ekspresją transgenów oraz brakiem genów wirusowych. Wektory takie uzyskuje się poprzez połączenie elementów genomu odpowiedzialnych za mechanizm replikacji AAV z fragmentami DNA biorącymi udział w enkapsydacji adenowirusów (28).

4.4. Wady wektora AAV

Niestety stosowanie wektorów AAV związane jest z pewnymi trudnościami.

Głównym ograniczeniem jest ich mała pojemność genetyczna (4-4,5 tysięcy zasad) (5,7,20).

Skuteczność transdukcji wektorów AAV różni się znacząco w różnych komórkach i tkankach *in vitro* i *in vivo*. Stwierdzono, że białko limfocytów T zdolne do wiązania leku immunosupresyjnego FK506 (białko FKBP52), oddziałuje na jednoniciową sekwencję końcowych powtórzeń DNA AAV, powodując zahamowanie syntezy drugiej nici wirusowego DNA- i w konsekwencji ograniczenie ekspresji transgenów. Fosforylacja tyrozyny komórkowego białka FKBP52 silnie wpływa na wydajność

transdukcji AAV, co może mieć duży wpływ na optymalne zastosowanie wektorów AAV w terapii genowej człowieka (29).

Niski poziom transdukcji obserwowany w komórkach niektórych typów nowotworów także ogranicza zastosowanie wektorów AAV w leczeniu (31).

Poza tym transfer genu za pośrednictwem AAV wywołuje niekiedy odpowiedź immunologiczną przeciw produktowi transgenemu, czego skutkiem jest obniżenie poziomu jego ekspresji, który zaobserwowano np. w mięśniach szkieletowych (26).

5. Zastosowanie wektorów AAV w terapii genowej

Pomimo kilku wymienionych wad AAV, podejmowane są liczne próby ich zastosowania jako wektorów w terapii genowej.

Wiele uwagi poświęca się możliwości wykorzystania terapii genowej do leczenia dystrofii mięśni typu Duchenne'a (DMD). Jest to najczęściej występująca śmiertelna choroba genetyczna człowieka sprzężona z chromosomem X. DMD dotyka jednego na 3500 mężczyzn i w 1/3 przypadków jest następstwem nowych, spontanicznych mutacji. Dotychczas nie opracowano sposobu leczenia DMD. U chorych obserwuje się postępujące zwyrodnienie mięśni prowadzące do śmierci z powodu niewydolności oddechowej lub sercowej, około 20. roku życia. Za chorobę odpowiedzialne są mutacje w genie *DMD*, kodującym dystrofinę. Są to delecje, często obejmujące duże fragmenty genomu, duplikacje oraz mutacje punktowe. Prowadzą one do zmiany w strukturze dystrofiny i w rezultacie zaburzeń w jej funkcjonowaniu w mięśniu poprzecznie prążkowanym. To powoduje niestabilność sarkolemmy, co z kolei prowadzi do trwałego uszkodzenia mięśnia po skurczu. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że domięśniowe dostarczenie (za pomocą wektorów AAV) prawidłowej kopii genu dystrofiny lub cDNA tego genu stabilizuje sarkolemmę, i to na długi okres (nawet ponad roku). W mięśniu po wprowadzeniu wektora zauważono jednak odpowiedź immunologiczną, w którą zaangażowane były komórki prezentujące antygeny, takie jak mioblasty czy regenerujące się, niedojrzałe włókna mięśniowe (26,27,32,33).

Wektory AAV są także poważnymi kandydatami do pośredniczenia w terapii wielu chorób neurologicznych. Oprócz wymienionych cech (patrz 4.1) przemawia za nimi zdolność do infekowania nie dzielących się (postmitotycznych) neuronów. Pierwszym klinicznym zastosowaniem AAV do transferu genu do komórek mózgu ludzkiego była terapia choroby Canavana, związanej z nieprawidłowościami w procesie mielinizacji mózgu. Genem terapeutycznym był gen acylazy asparaginianowej (ASPA), podawany drogą neurochirurgiczną. Dostępny jest protokół kliniczny leczenia z udziałem 21 pacjentów, natomiast nie opublikowano dotychczas wyników terapii (11,12,22,34-36).

Opracowywanych jest też kilka metod leczenia choroby Parkinsona z użyciem AAV. Jedną z nich jest miejscowa produkcja dopaminy w ciele prążkowanym uzyska-

na przez indukcję ekspresji enzymów syntetyzujących dopaminę. W tym celu chorym podaje się osobne wektory AAV kodujące 3 enzymy niezbędne do syntezy dopaminy. Wyniki doświadczeń prowadzonych na zwierzętach są obiecujące. Inna metoda ma na celu spowolnienie zwyrodnienia neuronów wydzielających dopaminę poprzez ekspresję czynników neurotroficznych lub mózgowego, pęcherzykowego transportera monoamin w ciele prążkowanym lub istocie czarnej mózgu (37).

W przypadku wielu chorób neurologicznych obserwuje się niekontrolowaną, patologiczną apoptozę. Proces ten można powstrzymać dostarczając geny kodujące czynniki antyapoptotyczne bezpośrednio do centralnego układu nerwowego, również z wykorzystaniem AAV. Tego typu terapia mogłaby być użyteczna w schorzeniach zwyrodnieniowych układu nerwowego, np. we wspomnianej chorobie Parkinsona (11).

W fazie prób klinicznych jest terapia genowa hemofilii B, w której choremu podaje się domięśniowo wektor AAV z genem kodującym czynnik IX. Możliwe jest, jak się wydaje, bezpieczne stosowanie nawet dużych dawek wektora. Innym testowanym sposobem dostarczenia czynnika IX jest wewnątrznosowe podanie wektora AAV2/5 wyposażonego w promotor specyficzny dla genów ulegających ekspresji w komórkach płuc- CC10. Zaletą tej metody jest jej nieinwazyjność, długotrwałe wydzielanie terapeutycznego białka oraz możliwość ponownego zastosowania tego samego serotypu AAV w pięć miesięcy po pierwszym podaniu (15,38,39).

Zrekombinowane wektory na bazie AAV są także zdolne do skutecznej transdukcji komórek siatkówki, dlatego podejmowane są próby zastosowania ich w leczeniu retinopatii. Tak na przykład dostarczenie przez AAV genu kodującego czynnik neurotroficzny uzyskany z komórek gębowych (GDNF) do siatkówki może chronić fotoreceptory przed ich degeneracją. W terapii siatkówki ważna jest kontrola poziomu terapeutycznego białka, zarówno jeśli chodzi o czas jak i miejsce jego ekspresji. W badaniach z wykorzystaniem erytropoetyny jako markera sugeruje się, że możliwa jest farmakologiczna kontrola ekspresji transgenu w oku za pomocą rapamycyny (5,30,40).

Terapia genowa może w przyszłości również znaleźć zastosowanie w leczeniu dystrofii rogówki. W pierwszym doniesieniu demonstrującym selektywny transfer genów do komórek rogówki królika wprowadzono wektory na bazie AAV oraz wektory plazmidowe opłaszczone lipidami, przenoszące geny beta-galaktozydazy i acetylotransferazy chloramfenikolowej. Oba wektory doprowadziły do ekspresji genu, przy czym ekspresja w następstwie transdukcji przez AAV była opóźniona o kilka dni, ale za to jej poziom był wyższy i ekspresja trwała dłużej (6).

Innym ważnym problemem klinicznym jest krytyczne niedokrwienie kończyn, które często skutkuje ich niepełnosprawnością, a nawet ich utratą. Wykazano, że dostarczenie zrekombinowanego białka czynnika wzrostu śródbłonna naczyńniowego (VEGF), lub jego genu, pobudza arteriogenezę i kapilarną angiogenezę u zwierząt dotkniętych tym schorzeniem. Do tego celu również zastosowano wektory AAV, które skutecznie transdukują mięśnie szkieletowe i umożliwiają długotrwałą

ekspresję transgenu. Wewnątrzłecznicy transfer AAV-VEGF(165) normalizuje niedobór tlenu w mięśniach i prowadzi do arteriogenezy u szczurów z poważnym niedotlenieniem kończyn tylnych (41).

Prawdopodobnie terapia genowa będzie miała ogromne znaczenie w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych. W badaniach nad skutecznością wektorów AAV w przenoszeniu genu lacZ do serca wykazano, że transfer genu zależy od dawki wektorów AAV-lacZ. Stwierdzono też, że ekspresja genu nie zmniejszyła się nawet po upływie sześćdziesięciu dni, na co pozytywny wpływ miał brak odpowiedzi immunologicznej. Można wnioskować, że wektory AAV dają możliwość skutecznego i jedностajnego transferu genów do mięśnia sercowego w modelu recyrkulacji wieńcowej (8,42).

Terapię genową z zastosowaniem wektorów AAV próbuje się zastosować również w leczeniu tak różnorodnych chorób jak: jaskry (10), cukrzyca (przez wprowadzenie genu kodującego insulinę) (43), choroby Fabry'ego (44), udaru mózgu (45), chorób neuronów ruchowych np. ALS (18), przewlekłej białaczki limfocytarnej (46), mukowiscydozy (mało skuteczne) (47), głuchoty (48), reumatoidalnego zapalenia stawów (49) czy chorób mięśni (21,50).

Transfer genów za pośrednictwem AAV może być także wykorzystany w celu zniesienia chronicznego bólu po uszkodzeniach układu nerwowego (51) oraz do korekcji uszkodzeń w podjednostce E1alfa kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (52).

5.1. Wektory AAV w leczeniu nowotworów

Osobnym zagadnieniem jest wykorzystanie AAV jako wektorów w leczeniu nowotworów. Zahamowanie angiogenezy nowotworowej uzyskuje się wprowadzając do komórek śródbłonna lub guza nowotworowego, np. gen endostatyny, której produkt zwiększa skuteczność radioterapii oraz hamuje proliferację i migrację komórek śródbłonna (53,54).

Wektory AAV stosowane są nie tylko do wprowadzania genów terapeutycznych, ale również genów zabójców. W tym przypadku do komórek nowotworowych dostarcza się wektor AAV z wklonowanym genem kinazy tymidynowej wirusa opryszczki (HSV-tk), eksponując je równocześnie na działanie leków: acyklowiru lub gancyklowiru (GCV). Transfer genów za pomocą AAV jest specyficzny. Ponieważ używane leki aktywowane są poprzez produkt genu HSV-tk, zniszczeniu ulegają te komórki, które zainfekowane zostały przez AAV. Metoda ta okazała się szczególnie skuteczna w przypadku komórek mięsaka HS-1 i HT1080, co jest ważne ze względu na to, że komórki te są mało podatne na chemioterapię. Wektor AAV-2 bardzo wydajnie transdukował komórki HS-1 i HT1080 (ponad 90%). Wszystkie transdukowane komórki zginęły już przy zastosowaniu takich dawek leku, przy których normalnie przeżywało ponad 90% komórek.

W innym przypadku połączono działanie HSV-tk wprowadzonej przez wektor AAV (AAVtk), gancyklowiru oraz promieniowania gamma. Sposób ten okazał się skuteczny w niszczeniu komórek raka krtani i HeLa. Zaletą kombinacji AAVtk/GCV z radioterapią jest nie tylko duża skuteczność, ale też zmniejszenie toksyczności obu czynników (31,55,56).

5.2. Wykorzystanie AAV w terapiach immunologicznych

Wirusy AAV mogą także służyć do przenoszenia genów kodujących cząsteczki liganda CD40 (CD40L) do limfocytów. Limfocyty B pozbawione tej cząsteczki nie są zdolne do skutecznej aktywacji limfocytów T, co jest przyczyną chronicznej białaczki limfocytarnej (CLL). Defekt ten można częściowo korygować właśnie przez genetyczny transfer CD40L do limfocytów B. Próbowano zastosować do tego celu adenowirusy, ale niezbędna do ich transdukcji okazała się wysoka koncentracja cząstek wirusowych na komórkę (wielokrotność infekcji do 2000) ze względu na brak receptora umożliwiającego wiązanie adenowirusów do limfocytów B. Ponadto możliwe jest, że adenowirusowe struktury włókniste powodują niespecyficzną stymulację immunologiczną. Dzięki swoim unikatowym właściwościom, również w tym przypadku AAV stały się obiektem zainteresowania jako potencjalne wektory. Do niedawna transdukcja wadliwych limfocytów B (B-CLL) za ich pomocą była mało efektywna, ze względu na niski poziom ekspresji transgeny. Ostatnie ulepszenia, m.in. wprowadzenie plazmidu kodującego produkty genów adenowirusowych (jako wirusa pomocniczego) umożliwiły stworzenie skutecznych i wolnych od samych adenowirusów wektorów rAAV. W przeprowadzonych badaniach w aktywacji limfocytów T pośredniczyły głównie limfocyty B-CLL aktywowane poprzez inkubację z komórkami transdukowanymi. Przypomina to sytuację szczepienia *in vivo*, gdzie liczba nie zainfekowanych komórek B-CLL znacznie przewyższałaby liczbę komórek transdukowanych. Zastosowanie tego bezpiecznego systemu wektorowego, jak się wydaje, nastąpi już w bliskiej przyszłości (57).

Receptory NMDA⁴ odgrywają w mózgu ważną rolę, wpływając na jego plastyczność i rozwój, a jednocześnie pośredniczą w uszkodzeniach neuronowych związanych z licznymi schorzeniami neurologicznymi, jak udarem, epilepsją, demencją i chorobami neurodegeneratywnymi. Liczne próby mające na celu wprowadzenie farmakologicznych antagonistów receptora NMDA nie dały oczekiwanych rezultatów, ponieważ ich skuteczność była niewielka, ponadto miały szkodliwe działania uboczne. Receptory NMDA składają się z trzech rodzajów podjednostek (NR1, NR2 i NR3A), tworzących heterooligomeryczne kompleksy. Podjednostki NR1 są niezbędne dla funkcji receptorów NMDA, podczas gdy pozostałe podjednostki modyfikują właściwości receptora. Alternatywnym podejściem do zantagonizowania receptorów NMDA może być wywołanie humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej przeciwko podjednostce NR1 tego receptora. Takie przeciwciała w normalnych wa-

runkach nie powinny penetrować do centralnego układu nerwowego, nie miałyby zatem toksycznego działania, natomiast w następstwie urazu mózgu mogłyby skuteczniej dostawać się do mózgu, zantagonizować receptor NMDA i osłabić uszkodzenia powstałe za pośrednictwem tego receptora. Również w tym przypadku optymalnymi wektorami są, jak się wydaje, AAV (58).

Wektory na bazie AAV próbuje się także wykorzystać przy produkcji szczepionek (59). Genetyczna immunizacja polega na dostarczeniu genu kodującego odpowiedni antygen do docelowych komórek gospodarza, w celu wywołania humoralnej bądź komórkowej odpowiedzi immunologicznej.

Rak szyjki macicy jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych chorób na świecie, co roku diagnozowanych jest pół miliona nowych przypadków. Dominującym czynnikiem etiologicznym dla tego typu nowotworu jest ludzki papillomavirus typu 16 (HPV-16), przenoszący trzy transformujące onkogeny- E5, E6 i E7. Ich produkty są zatem unikatowymi antygenami nowotworowymi i mogą być używane jako szczepionki. Opracowywane są różne strategie szczepienia, przy użyciu wektorów wirusowych (wirusy vaccinia i żółtaczkki typu B) oraz niewirusowych. Wektory AAV łączą w sobie najlepsze cechy obu grup. Jedynym wirusowym DNA, które musi być zawarte w takim wektorze są 145-zasadowe końcowe powtórzenia. Dzięki temu jedynym genem przenoszonym przez wektor AAV i ulegającym ekspresji jest wkłonowany antygen. Co więcej, użycie tego wektora nie jest związane z silną komórkową odpowiedzią immunologiczną przeciwko transdukowanym komórkom, co pozwala na długotrwałą ekspresję przeniesionego genu (60).

Już od wielu lat liczne grupy naukowców prowadzą badania mające na celu opracowanie szczepionki przeciwko HIV. Próbuje się to osiągnąć na wiele sposobów, również z udziałem AAV. Tworzone są wektory rAAV przenoszące gen *env* wirusa HIV, zawierające geny Rep i Cap oraz końcowe powtórzenia AAV. Dodatkowo, zamiast wirusa pomocniczego dodawane są geny E2A, E4 oraz VA adenowirusa. W badaniach przeprowadzonych na myszach, wektory te znacznie wzmocniły humoralną odpowiedź immunologiczną (61,62). Inną szczepionką jest plazmid kodujący gen *env* opatrzony promotorem CMV. Włączenie końcowych powtórzeń o odwróconej polarności pochodzących z DNA AAV do rejonu regulatorowego tego plazmidu zwiększa ekspresję transgenu i immunogenność szczepionki (63).

Kolejne możliwości otworzą się w chwili, kiedy wektory AAV zostaną zastosowane do genetycznej modyfikacji komórek dendrycznych. Komórki te pełnią podstawową rolę w odpowiedzi immunologicznej, jako komórki prezentujące antygeny. Dostarczenie genów kodujących antygeny do komórek dendrycznych skutkuje długotrwałą ekspresją antygeny oraz pozwala na modulację receptorów komórkowych i wydzielanie cytokin przez te komórki. Co ważne, transdukcja komórek dendrycznych za pomocą zrekombinowanych AAV w warunkach *in vitro* nie wpływa na żywotność, fenotyp ani funkcje immunologiczne tych komórek. Metoda ta może przyczynić się do złagodzenia szerokiego wachlarza stanów chorobowych: nowotworów, zapaleń, autoimmunizacji i alergii (64-68).

Lista schorzeń, w leczeniu lub zapobieganiu którym próbuje się zastosować wektory na bazie AAV, jak widać jest długa. Rezultaty wielu badań są obiecujące, niektóre są już w fazie klinicznej. Wszystko wskazuje zatem na to, że terapia genowa z zastosowaniem wektorów AAV będzie odgrywać znaczną rolę w medycynie już w niedalekiej przyszłości.

6. Uwagi końcowe

Wirusy typu DNA, tj. adenowirusy, wirusy herpes czy AAV są szeroko stosowane w biotechnologii jako wektory do wprowadzania obcych genów do komórek ludzkich. Decyduje o tym ich specyficzny tropizm do komórek określonych typów, jak również możliwość zastąpienia genów wirusowych genem terapeutycznym. Wirusy te wywołują jednak niekiedy niepożądane skutki uboczne, np. wykazują właściwości immunogenne i są toksyczne dla organizmu. Dlatego do transferu obcych genów próbuje się także zastosować liposomy. Są to sztucznie otrzymanywane mikroskopijne pęcherzyki lipidowe, które można wypełniać substancjami, które chcielibyśmy wprowadzić do komórki. Efekt specyficznego ich kierowania do komórek docelowych można osiągnąć w wyniku modyfikacji ich parametrów fizycznych, tj. wielkości, wrażliwości na pH, temperaturę lub po wprowadzeniu na ich powierzchnię cząsteczek, które reagują specyficznie z komórką docelową, podobnie jak wirusy. Błony liposomów można tak modyfikować, że nie będą miały właściwości immunogenne i nie będą toksyczne dla organizmu, a równocześnie, podobnie jak wirusy, będą wykazywać specyficzny tropizm do określonych komórek.

Skróty:

- 1) CK6 – promotor cytokeratyny, specyficzny dla mięśni
- 2) MCK – promotor mięśniowej kinazy kreatyninowej, specyficzny dla mięśni
- 3) CC10 – promotor specyficzny dla płuc (pochodzi z genu białka clara cell 10 kDa)
- 4) NMDA – kanał wapniowy, receptor kwasu glutaminowego (można go naśladować N-metylo-D-asparaginianem, stąd nazwa)

Literatura:

1. Berns K. I., (1996), *Fields Virology*, Eds. Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. i in., (1996), 2173-2197, Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia.
2. Gao G. P., Alvira M. R., Wang L., Calcedo R., Johnston J., Wilson J. M., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 11854-11859.
3. Bantel-Schaal U., Delius H., Schmidt R., zur Hausen H., (1999), *J. Virol.*, 73, 939-947.
4. Xiao W., Chirmule N., Berta S. C., McCullough B., Gao G., Wilson, J. M., (1999) *J. Virol.*, 73, 3994-4003.
5. Reich S. J., Auricchio A., Hildinger M., Glover E., Maguire A. M., Wilson J. M., Bennett J., (2003), *Hum Gene Ther.*, 14, 37-44.

6. Mohan R. R., Schultz G. S., Hong J. W., Mohan R. R., Wilson S. E., (2003), *Exp. Eye Res.*, 76, 373-383.
7. Lai C. M., Lai Y. K., Rakoczy P. E., (2002), *DNA Cell Biol.*, 21, 895-913.
8. Asfour B., Baba H. A., Scheld H. H., Hruban R. H., Hammel D., Byrne B. J., (2002), *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 50, 347-350.
9. Ponnazhagan S., Mahendra G., Kumar S., Thompson J. A., Castillas M. Jr, (2002), *J. Virol.*, 76(24), 12900-12907.
10. Martin K. R., Klein R. L., Quigley H. A., (2002), *Methods*, 28(2), 267-275.
11. Mochizuki H., Miura M., Shimada T., Mizuno Y., (2002) *Methods*, 28(2), 248-252.
12. Okada T., Nomoto T., Shimazaki K., Lijun W., Lu Y., Matsushita T., Mizukami H., Urabe M., Hanazono Y., Kume A., Muramatsu S., Nakano I., Ozawa K., (2002), *Methods*, 28(2), 237-247.
13. Pruchnic R., Yokoyama T., Lee J. Y., Huard J., Chancellor M. B., (2002), *Urol. Res.*, 30(5), 310-316.
14. Pajusola K., Gruchala M., Joch H., Luscher T. F., Yla-Herttua S., Bueler H., (2002), *J. Virol.*, 76(22), 11530-11540.
15. Auricchio A., O'Connor E., Weiner D., Gao G. P., Hildinger M., Wang L., Calcedo R., Wilson J. M., (2002), *J. Clin. Invest.*, 110(4), 499-504.
16. Monahan P. E., Samulski R. J., (2000), *Mol. Med. Today*, 6, 433-440.
17. Hickman A. B., Ronning D. R., Kotin R. M., Dyda F., (2002), *Mol. Cell*, 10(2), 327-337.
18. Wang L. J., Lu Y. Y., Muramatsu S., Ikeguchi K., Fujimoto K., Okada T., Mizukami H., Matsushita T., Hanazono Y., Kume A., Nagatsu T., Ozawa K., Nakano I., (2002), *J. Neurosci.*, 22(16), 6920-6928.
19. Smith R. H., Afione S. A., Kotin R. M., (2002), *Biotechniques*, 33(1), 204-206, 208, 210-211.
20. Owens R. A., (2002) *Curr. Gene Ther.*, 2(2), 145-159.
21. Sanlioglu S., Monick M. M., Luleci G., Hunninghake G. W., Engelhardt J. F., (2001), *Curr. Gene Ther.*, 1(2), 137-147.
22. Mastakov M. Y., Baer K., Symes C. W., Leightlein C. B., Kotin R. M., During M. J., (2001), *J. Virol.*, 76(16), 8446-8454.
23. Lam P., Hui K. M., Wang Y., Allen P. D., Louis D. N., Yuan C. J., Breakefield X. O., (2002), *Hum. Gene Ther.*, 13(18), 2147-2159.
24. Nicklin S. A., Baker A. H., (2002), *Curr Gene Ther*, 2(3), 273-293.
25. Halbert C. L., Rutledge E. A., Allen J. M., Russell D. W., Miller A. D., (2000), *J. Virol.*, 74, 1524-1532.
26. Yuasa K., Sakamoto M., Miyagoe-Suzuki Y., Tanouchi A., Yamamoto H., Li J., Chamberlain J. S., Xiao X., Takeda S., (2002), *Gene Ther.*, 9(23), 1576-1588.
27. Yue Y., Dongsheng D., (2002), *Biotechniques*, 33, 672-678.
28. Goncalves M. A., van der Velde I., Janssen J. M., Maassen B. T., Heemskerk E. H., Opstelten D. J., Knaan-Shanzer S., Valerio D., de Vries A. A., (2002), *J. Virol.*, 76, 10734-10744.
29. Qing K., Li W., Zhong L., Tan M., Hansen J., Weigel-Kelley K. A., Chen L., Yoder M. C., Srivastava A., (2003), *J. Virol.*, 77, 2741-2746.
30. Auricchio A., Rivera V. M., Clackson T., O'Connor E. E., Maguire A. M., Tolentino M. J., Bennett J., Wilson J. M., (2002), *Mol. Ther.*, 6, 238-242.
31. Kanazawa T., Mizukami H., Okada T., Hanazono Y., Kume A., Nishino H., Takeuchi K., Kitamura K., Ichimura K., Ozawa K., (2003), *Gene Ther.*, 10, 51-58.
32. Watchko J., O'Day T., Wang B., Zhou L., Tang Y., Li J., Xiao X., (2002), *Hum. Gene Ther.*, 13, 1451-1460.
33. Takeda S., (2001), *Rinsho Shinkeigaku*, 41, 1154-1156.
34. Haberman R. P., McCown T. J., (2002), *Methods*, 28, 219-226.
35. Janson C., McPhee S., Bilaniuk L., Haselgrove J., Testaiuti M., Freese A., Wang D. J., Shera D., Hurh P., Rupin J., Saslow E., Goldfarb O., Goldberg M., Larijani G., Sharrar W., Liouterman L., Camp A., Kolodny E., Samulski J., Leone P., (2002), *Hum. Gene Ther.*, 13, 1391-1412.
36. Haskell R. E., Hughes S. M., Chiorini J.A., Alisky J. M., Davidson B. L., (2003), *Gene Ther.*, 10, 34-42.
37. Muramatsu S., (2001), *Rinsho Shinkeigaku*, 41, 1157-1159.
38. Herzog R. W., Hagstrom J. N., (2001), *Am. J. Pharmacogenomics*, 1(2), 137-144.
39. Herzog R. W., Fields P. A., Arruda V. R., Brubaker J. O., Armstrong E., McClintock D., Bellinger D. A., Couto L. B., Nichols T. C., High K. A., (2002), *Hum. Gene Ther.*, 13, 1281-1291.

40. Wu W. C., Lai C. C., Chen S. L., Xiao X., Chen T. L., Tsai R. J., Kuo S. W., Tsao Y. P., (2002), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43, 3480-3488.
41. Chang D. S., Su H., Tang G. L., Brevetti L. S., Sarkar R., Wang R., Kan Y. W., Messina L. M., (2003), *Mol. Ther.*, 7, 44-51.
42. Yasukawa H., Yajima T., Duplain H., Iwatate M., Kido M., Hoshijima M., Weitzman M. D., Nakamura T., Woodard S., Xiong D., Yoshimura A., Chien K. R., Knowlton K. U., (2003), *J. Clin. Invest.*, 111, 469-478.
43. Jindal R. M., Karanam M., Shah R., (2001), *Int. J. Exp. Diabetes Res.*, 2, 129-138.
44. Takahashi H., Hirai Y., Migita M., Seino Y., Fukuda Y., Sakuraba H., Kase R., Kobayashi T., Hashimoto Y., Shimada T., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 13777-13782.
45. Tsai T. H., Chen S. L., Xiao X., Liu D. W., Tsao Y. P., (2002), *Methods*, 28, 253-258.
46. Wendtner C. M., Kofler D. M., Theiss H. D., Kurzeder C., Buhmann R., Schweighofer C., Perabo L., Danhauser-Riedl S., Baumert J., Hiddemann W., Hallek M., Buning H., (2002), *Blood*, 100, 1655-1661.
47. Wagner J. A., Nepomuceno I. B., Messner A. H., Moran M. L., Batson E. P., Dimiceli S., Brown B. W., Desch J. K., Norbash A. M., Conrad C. K., Guggino W. B., Flotte T. R., Wine J. J., Carter B. J., Reynolds T. C., Moss R. B., Gardner P., (2002), *Hum. Gene Ther.*, 13, 1349-1359.
48. Li Duan M., Bordet T., Mezzina M., Kahn A., Ulfendahl M., (2002), *Neuroreport*, 13, 1295-1299.
49. Apparailly F., Millet V., Noel D., Jacquet C., Sany J., Jorgensen C., (2002), *Hum. Gene Ther.*, 13, 1179-1188.
50. Abadie J., Blouin V., Guigand L., Wyers M., Cheral Y., (2002), *Gene Ther.*, 9(15), 1037-1043.
51. Eaton M. J., Blits B., Ruitenber M. J., Verhaagen J., Oudega M., (2002), *Gene Ther.*, 9(20), 1387-1395.
52. Owen R. 4th, Mandel R. J., Ammini C. V., Conlon T. J., Kerr D. S., Stacpoole P. W., Flotte T. R., (2002), *Mol. Ther.*, 6, 394-399.
53. Shi W., Teschendorf C., Muzyczka N., Siemann D. W., (2003), *Radiother. Oncol.*, 66, 1-9.
54. Zhang Z., Zhang Z., Zeng G., Zhang L., Xu C., Guo Y., (2002), *Chin. Med. J. (Engl)*, 115, 1209-1212.
55. Fruehauf S., Veldwijk M. R., Berlinghoff S., Basara N., Baum C., Flasshove M., Hegewisch-Becker S., Kroger N., Licht T., Moritz T., Hengge U. R., Zeller W. J., Laufs S., (2002), *Cells Tissues Organs*, 172, 133-144.
56. Janouskova O., Sima P., Kunke D., (2003), *Int. J. Oncol.*, 22, 569-577.
57. Wendtner C. M., Kofler D. M., Theiss H. D., Kurzeder C., Buhmann R., Schweighofer C., Perabo L., Danhauser-Riedl S., Baumert J., Hiddemann W., Hallek M., Buning H., (2002), *Blood*, 100(5), 1655-1661.
58. Doring M. J., Symes C. W., Lawlor P. A., Lin J., Dunning J., Fitzsimons H. L., Poulsen D., Leone P., Xu R., Dicker B. L., Lipski J., Young D., (2000), *Science*, 287, 1453-1460.
59. Clark K. R., Johnson P. R., (2001), *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 3(4), 375-384.
60. Liu D. W., Tsao Y. P., Kung J. T., Ding Y. A., Sytwu H. K., Xiao X., Chen S. L., (2000), *J. Virol.*, 74, 2888-2894.
61. Xin K. Q., Ooki T., Mizukami H., Hamajima K., Okudela K., Hashimoto K., Kojima Y., Jounai N., Kumamoto Y., Sasaki S., Klinman D., Ozawa K., Okuda K., (2002), *Hum. Gene Ther.*, 13, 1571-1581.
62. Xin K. Q., Urabe M., Yang J., Nomiya K., Mizukami H., Hamajima K., Nomiya H., Saito T., Imai M., Monahan J., Okuda K., Ozawa K., Okuda K., (2001), *Hum. Gene Ther.*, 12, 1047-1061.
63. Xin K. Q., Ooki T., Jounai N., Mizukami H., Hamajima K., Kojima Y., Ohba K., Toda Y., Hirai S., Klinman D. M., Ozawa K., Okuda K., (2003), *J. Gene Med.*, 5, 438-445.
64. Ponnazhagan S., Mahendra G., Curiel D. T., Shaw D. R., (2001), *J. Virol.*, 75, 9493-9501.
65. Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.-J., Pulendran B., Palucka K., (2000), *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 767-811.
66. Banchereau J., Steinman R. M., (1998), *Nature*, 392, 245-252.
67. Sallusto F., Lanzavecchia A., (1999), *J. Exp. Med.*, 189, 611-614.
68. Timmerman J. M., Levy R., (1999), *Annu. Rev. Med.*, 50, 507-529.