

Perspektywy terapii genowej chorób neurologicznych

Perspectives of gene therapy in neurological diseases

JERZY NOWAK, DANUTA JANUSZKIEWICZ-LEWANDOWSKA

Z Zakładu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

STRESZCZENIE. *Terapia genowa jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin medycyny. Terapia genowa stwarza olbrzymie możliwości leczenia wielu nabytych i wrodzonych chorób neurologicznych, w których zidentyfikowano określony defekt genetyczny. Zastosowanie specyficznych wektorów umożliwia wprowadzenie terapeutycznych genów do komórek docelowych metodą ex vivo i in vivo. Uzyskanie obiecujących wyników na modelach zwierzęcych pozwala przypuszczać, że w przyszłości technologia transferu genu będzie mogła być wykorzystana w leczeniu choroby Parkinsona i Alzheimerera. W przeprowadzonych próbach klinicznych z zastosowaniem transferu genów samobójców i gancyklowiru zaobserwowano regresję guzów mózgu. Należy przypuszczać, że w przyszłości technologia transferu genu stanie się powszechną metodą zapobiegania i leczenia chorób neurologicznych.*

SUMMARY. *Gene therapy is one of the most rapidly developing branches of medicine. Gene therapy provides enormous possibilities of treatment of many acquired and inborn neurological conditions, in which a definite genetic defect has been identified. The application of specific vectors allows to introduce therapeutic genes into target cells by means of the ex vivo and in vivo methods. Since promising results have been obtained in animal models, it can be assumed that in the future the gene transfer therapy may be used in the treatment of parkinsonism and Alzheimer's disease. In clinical trials using suicides' genes transfer and gancyclovire, regression of cerebral tumors has been noted. It may be hoped that in the future the gene transfer therapy will be a common method of neurological diseases prevention and treatment.*

Słowa kluczowe: terapia genowa / transfer genu / choroba Alzheimerera / choroba Parkinsona
Key words: gene therapy / gene transfer / Alzheimer's disease / Parkinson's disease

W ciągu ostatnich kilku lat obserwujemy dynamiczny rozwój nowej dyscypliny medycznej, za jaką można uważać terapię genową. Pomimo braku wykazania skuteczności terapii genowej, zarówno w chorobach genetycznych jak i nowotworowych, perspektywy dalszego jej rozwoju i praktycznego zastosowania zapowiadają się niezwykle obiecująco. W klasycznym ujęciu terapia genowa polega na próbie uzyskania efektu leczniczego poprzez wprowadzenie do komórki genu prawidłowego w miejsce

brakującego lub zmutowanego. Bardzo szybko okazało się, że manipulacje genetyczne dla celów terapeutycznych mogą być wykorzystane nie tylko w chorobach uwarunkowanych genetycznie, ale również w chorobach nowotworowych, zakaźnych oraz w neurologicznych [4, 5].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie, na podstawie doświadczeń przeprowadzonych głównie na zwierzętach, możliwości terapii genowej oraz perspektyw jej wykorzystania w leczeniu chorób neurologicznych.

FORMY TERAPII GENOWEJ

Możliwe formy terapii genowej obejmują [7]:

- wprowadzenie prawidłowego genu bez zmiany genu zmutowanego
- modyfikację genu *in situ*
- „chirurgię genową” polegającą na wycięciu genu z defektem i insercji genu prawidłowego
- zastosowanie kombinacji wymienionych form

Potencjalne formy manipulacji informacją genetyczną człowieka obejmują:

- somatyczną terapię genową
- terapię genową komórek rozrodczych
- wzmocnienie genetyczne oraz genetyczną eugenikę

Z uwagi na możliwości techniczne, a przede wszystkim ze względów etycznych podejmowane próby kliniczne dotyczą wyłącznie terapii genowej komórek somatycznych. Należy bardzo wyraźnie oddzielić terapię genową od historycznie niechlubnej, eugeniki genetycznej polegającą na poprawianiu pod nadzorem instytucji państwowej takich cech populacji człowieka, jak: inteligencja, osobowość, uzdolnienia itp.

POCZĄTKI I ROZWÓJ TERAPII GENOWEJ

Początki terapii genowej sięgają roku 1980, kiedy Martin Cline dokonał nieudanej próby wprowadzenia genu globiny do komórek szpiku kostnego chorego na talasemię. Ze względu na niedoskonałość technologii transferu genu i niepowodzenie Cline'a, wprowadzono blisko dziesięcioletnie moratorium na wszelkie próby kliniczne z wykorzystaniem technologii transferu genu. Dopiero w 1990 roku dokonano pierwszego udanego transferu genu deaminazy adenozyliny do limfocytów 4-letniej dziewczynki z ciężkim złożonym niedoborem odporności (SCID – *severe combined immune deficiency*). Od tego czasu wykonano na całym świecie kilkaset prób klinicznych z zastosowaniem transferu genu w różnych chorobach, głównie nowotworowych, genetycznych i AIDS. Do tej pory całkowite wyleczenie uzyskano tylko u jednego pacjenta z zaawansowanym czerniakiem złośliwym z przerzutami. Należy jednak dodać, że właśnie w czerniaku złośliwym często obserwuje się spontaniczną regresję objawów chorobowych. Natomiast u części pacjentów z chorobami nowotworowymi uzyskano znaczącą poprawę, co niestety nie przesądza jeszcze o wyleczeniu, które będzie można potwierdzić dopiero po kilkuletniej obserwacji. Pomimo że u pierwszej pacjentki z SCID po kilkakrotnym transferze genu deaminazy adenozyliny do limfocytów uzyskano dużą poprawę kliniczną, to jednak w dalszym ciągu otrzymuje ona leczenie podtrzymującymi dawkami deaminazy adenozyliny z polietyloglikolem (ADA-PEG).

TRANSFER GENU DO KOMÓREK SOMATYCZNYCH

Wprowadzenie terapeutycznego genu ma na celu wzmocnienie słabej funkcji, rekonstrukcję brakującej czynności lub supresję niepożądaną aktywności. Transfer terapeutycznego genu do komórki można dokonać dwoma zasadniczymi sposobami. Pierwszy *ex vivo* obejmuje pobranie od chorego komórek lub tkanki, ich hodowlę *in vitro*, transfer genu i autologiczną transplantację genetycznie zmodyfikowanych komórek. Drugi, trudniejszy sposób – transfer genu *in vivo* polega na wprowadzeniu terapeutycznego genu bezpośrednio do komórek chorego. Zasadniczym ograniczeniem transferu genu *in vivo* jest zastosowanie nośnika – wektora, który przenosi w sposób swoisty i z dużą wydajnością gen terapeutyczny do komórek docelowych [9]. Koniecznym warunkiem wprowadzenia terapeutycznego genu do komórki jest uzyskanie odpowiednich

wektorów, zdolnych do transdukcji określonego genu do komórek docelowych. Transfer leczniczego genu do komórki docelowej i uzyskanie jego stabilnej ekspresji stanowi jeden z elementów powodzenia terapii genowej. Gen można wprowadzić do komórki różnymi metodami fizykochemicznymi, z których w terapii genowej wykorzystywana jest technika elektroporacji i wprowadzania liposomów po fuzji DNA. Z metod biologicznych powszechnie wykorzystuje się wprowadzanie do komórki genów za pomocą różnego rodzaju wektorów.

W terapii genowej chorób neurologicznych wykorzystywane są wektory pochodne wirusa opryszczki pospolitej, wektory retrovirusowe, adenowirusowe i wektory pochodne adenowirusa (AAV, *adeno associated virus*) [1, 3]. Wektory pochodne wirusa opryszczki (HSV – *herpes simplex virus*) mogą być bardzo przydatne w terapii genowej chorób neurologicznych z uwagi na ich neurotropizm i łatwą zdolność do infekcji wielu komórek. Wektory HSV o wielkości 150 Kbp DNA mogą „pomieścić” insert wielkości do 20 Kbp. Charakteryzują się wysoką wydajnością transdukcji neuronów i komórek glejowych. Mogą infekować również komórki nie dzielące się, nie integrują się jednak z genomem komórki i co za tym idzie wykazują stosunkowo krótkotrwałą, rzędu kilku tygodni, ekspresję transgenu. Wektory HSV mogą mieć w przyszłości zastosowanie do wprowadzania terapeutycznych genów głównie w leczeniu choroby Parkinsona. W doświadczeniach na zwierzętach próbuje się stosować atenuowane mutanty HSV replikujące tylko w komórkach guza. W chorobach neurologicznych mogą być również wykorzystane do transferu genu wektory rethrowirusowe. Ograniczeniem stosowania tych wektorów jest ich zdolność do infekcji wyłącznie komórek dzielących się. Nie posiadają zdolności do replikacji i mogą tylko jednorazowo zainfekować komórkę. Wektory rethrowirusowe charakteryzuje wysoka wydajność transferu genu i stabilna integracja z genomem komórki.

W doświadczeniach na modelu zwierzęcym w chorobach układu nerwowego praktycznie nie są wykorzystywane wektory adenowirusowe i wektory pochodne AAV.

W terapii genowej stosuje się również metody fizykochemicznego transferu genu do komórek docelowych. Do metod tych można zaliczyć wprowadzenie terapeutycznego genu przez liposomy, elektroporacje, transfekcję DNA wytrąconego fosforanem wapnia i bezpośrednią iniekcję DNA. Tą ostatnią metodę można stosować wyłącznie w odniesieniu do komórek mięśniowych.

KOMÓRKI DOCELOWE W TERAPII CHOROBY NEUROLOGICZNYCH

Komórkami docelowymi w terapii chorób neurologicznych mogą być komórki glejowe, płodowe komórki neuronalne, astrocyty, oligodendrocyty, komórki Schwanna, fibroblasty oraz mioblasty [1, 3]. W doświadczalnych modelach terapii genowej chorób neurologicznych duże nadzieje wiąże się z genetycznie modyfikowanymi fibroblastami i mioblastami. Prekursorowe komórki neuronalne mogą być przeszczepiane jako niemodyfikowane, które różnicują się do dojrzałych neuronów w warunkach *in vivo*. Ponadto istnieje możliwość genetycznej modyfikacji komórek prekursorowych *in vitro*. Oddzielną grupę stanowią komórki nowotworów centralnego układu nerwowego, do których można bezpośrednio, *in vivo*, wprowadzać terapeutyczny gen [2, 6, 12].

MOŻLIWOŚCI GENOTERAPII CHOROBY PARKINSONA

Choroba Parkinsona jest jedną z najczęstszych chorób neurodegeneracyjnych, występującą u około 0.1–1% populacji. Dużą część przypadków choroby Parkinsona wiąże się z brakiem czynników neurotroficznych, działaniem wolnych rodników tlenowych lub ekspozycją na inne toksyny. Cechą charakterystyczną jest utrata neuronów produkujących dopaminę. Leczenie choroby

Parkinsona doustnym podawaniem pochodnych dopaminy staje się mniej skuteczne w miarę postępu procesu chorobowego. Miejscowe dostarczenie L-DOPA poprzez transfer genu wydaje się być atrakcyjną alternatywą. Można to osiągnąć poprzez transfer *in situ* neuronów produkujących hydroksylazę tyrozyny, która jest odpowiedzialna za biosyntezę L-DOPA z tyrozyny. Transfer genu hydroksylazy tyrozyny *in situ* mógłby zwiększać miejscową produkcję L-DOPA. Na modelu zwierzęcym wykazano dużą skuteczność w eliminacji objawów braku L-DOPA poprzez transfer genu hydroksylazy tyrozynowej, który hamował objawy spowodowane podawaniem neurotoksyny (6-hydroksydopaminy) niszczącej neurony dopaminergiczne [1, 3]. W badaniach modelowych u szczura wprowadzono gen hydroksylazy tyrozyny stosując wektory wirusa opryszczki, charakteryzujące się wysokim neurotropizmem. Podobnie pozytywne wyniki uzyskano przy pomocy wektorów pochodnych adenowirusa (AAV, *adeno associated virus*). Obiecujące wyniki uzyskano również poprzez wszczepianie genetycznie modyfikowanych fibroblastów i mioblastów syntetyzujących hydroksylazę tyrozyny. Należy wspomnieć o niezwykle atrakcyjnych wynikach u myszy transgenicznych z wysoką ekspresją dysmutazy nadtlenkowej. U myszy tych wykazano oporność komórek produkujących dopaminę na uszkodzenia przez wolne rodniki.

PERSPEKTYWY TERAPII GENOWEJ CHOROBY ALZHEIMERA

Choroba Alzheimerera charakteryzuje się postępującym ośpieniem spowodowaną przez atrofię kory mózgu, utratę neuronów, odkładanie się złogów beta-amyloidu w korze mózgu i hipokampie oraz degenerację neuronów cholinergicznnych. Zapobieganie degeneracji neuronów cholinergicznnych można osiągnąć przez egzogenne podawanie czynnika wzrostu NGF (*nerve growth factor*). Podobny efekt można osiągnąć po-

przez transplantację genetycznie modyfikowanych fibroblastów produkujących NGF [1, 3]. Pozytywne wyniki uzyskano na modelu szczura, gdzie zaobserwowano wzrost liczby neuronów z receptorami dla NGF. Zachęcające wyniki do przyszłej genoterapii choroby Alzheimerera osiągnięto u zwierząt poprzez przeszczepy genetycznie modyfikowanych fibroblastów produkujących brakujące neurotransmitery, np. acetylocholinę. W badaniach na zwierzętach uzyskano pozytywne efekty genoterapii mierzone zdolnością do uczenia i zapamiętywania.

PRÓBY TERAPII GENOWEJ GUZÓW MÓZGU

Duże nadzieje w leczeniu guzów mózgu wiąże się z terapią genową prowadzoną *in vivo*. W przeciwieństwie do tkanki mózgowej, której komórki nie ulegają podziałom, komórki guzów mózgu wykazują wysokie tempo proliferacji. Teoretycznie, do szybko dzielących się komórek guzów mózgu można wprowadzać terapeutyczne geny, które nie ulegają transferowi do komórek prawidłowych. Aktualne strategie terapii genowej guzów mózgu obejmują bezpośrednie niszczenie komórek nowotworowych poprzez transfer genów kodujących toksyny [10, 11]. Największe nadzieje związane są z bezpośrednim wprowadzaniem do tkanki guza genów tzw. „samobójców” pochodnych wirusa opryszczki pospolitej, kodujących kinazę tymidynową [6, 8]. Enzym ten powoduje konwersję nietoksycznego gancyklowiru w środek niszczący komórki nowotworowe. W przypadku transferu genu kinazy tymidynowej do komórek guza mózgu obserwuje się tzw. *bystandar effect*, polegający na niszczeniu przez gancyklowir również komórek, w których nie doszło do ekspresji genu kinazy tymidynowej HSV. W doświadczeniach na zwierzętach wykazano, że w celu całkowitego zniszczenia tkanki guza wystarczy efektywny transfer genu kinazy tymidynowej do około 20% komórek guza. Niezwykle pomyślne wyniki, polegające na

całkowitej regresji glejaka 9L u szczura, uzyskano poprzez wprowadzenie do tkanki nowotworowej fibroblastów produkujących kinazę tymidyny HSV z następowym podaniem gancyklowiru. W próbach klinicznych poddano terapii genowej z zastosowaniem transferu genu kinazy tymidynowej HSV kilkudziesięciu pacjentów z guzami mózgu. Z uwagi na zbyt krótki okres obserwacji trudno mówić o wyleczeniu chorych z guzami mózgu poprzez transfer genu kinazy tymidynowej i podawanie gancyklowiru, jednakże wstępne wyniki obserwacji klinicznych poparte monitorowaniem przy pomocy rezonansu magnetycznego wskazują na wyraźne zmniejszenie się objętości guza. Na ostateczną ocenę wyników leczenia guzów mózgu transferem genu kinazy tymidynowej i podawaniem gancyklowiru należy jeszcze poczekać.

PRZYSZŁOŚĆ TERAPII GENOWEJ W NEUROLOGII

Z innych strategii o potencjalnie dużym znaczeniu w przyszłości wymienić należy korektę zmutowanych genów przeciwnowotworowych, hamowanie ekspresji onkogenów przez transfer sekwencji antysensownych. Mniejsze znaczenie w przyszłościowej terapii genowej chorób neurologicznych będą miały strategie prowadzące do zwiększania immunogenności komórek nowotworowych oraz wzmacnianie swoistej aktywności przeciwnowotworowej limfocytów cytotoksycznych. Nie można wykluczyć, że dzięki technologii transferu genu będzie możliwa regeneracja ognisk demielinizacyjnych w stwardnieniu rozsianym.

Terapia genowa chorób neurologicznych dopiero zaczyna się rozwijać. Obecny etap jej rozwoju nie pozwala jeszcze mówić o skutecznym wyleczeniu jakiegokolwiek choroby,

a szczególnie choroby nowotworowej. Z tego względu nie należy stwarzać nadziei, zwłaszcza ciężko chorym pacjentom, na „cudowne” wyleczenie za pomocą nowej formy terapii. Można mieć natomiast pewność, że w przyszłości terapia genowa będzie stawała się podstawową metodą w zapobieganiu i leczeniu chorób neurologicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Blömer U., Naldini L., Verma I.M., Trono D., Gage F.H.: Application of gene therapy to the CNS. *Hum. Mol. Gen.* 1996, 5, 1397–1404.
2. Deonarain M.P., Spooner R.A., Epenetos A.A.: Genetic delivery of enzymes for cancer therapy. *Gene Therapy* 1995, 2, 235–244.
3. Friedmann T.: Gene therapy for neurological disorders. *TIG* 1994, 10, 6, 210–214.
4. Gilboa E., Smith C.: Gene therapy for infectious diseases: the AIDS model. *TIG* 1994, 10, 139–144.
5. Kay M.A., Woo S.L.C.: Gene therapy for metabolic disorders. *TIG* 1994, 10, 253–257.
6. Moolten F.L.: Drug sensitivity („suicide”) genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Therapy* 1994, 1, 279–287.
7. Nowak J.: Postępy terapii genowej chorób dziedzicznych. *Kosmos* 1994, 43, 2, 571–584.
8. Nowak J.: Możliwości i perspektywy terapii genowej chorób nowotworowych. *Kosmos* 1995, 44, 2, 465–478.
9. Ostrove J.M.: Safety testing programs for gene therapy viral vectors. *Cancer Gene Therapy* 1994, 1, 125–131.
10. Scott M.F., Zwiebel J.A.: Gene therapy of cancer. *Cancer Investigation* 1993, 11, 676–688.
11. Sikora K.: Genetic approaches to cancer therapy. *Gene Therapy* 1994, 1, 149–151.
12. Tapscott S.J., Miller A.D., Olson J.M., Berger M.S., Groudine M., Spence A.M.: Gene therapy of rat 9L gliosarcoma tumors by transduction with selectable genes does not require drug selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 97, 8185–8189.

*Adres: Dr Jerzy Nowak, Zakład Genetyki Człowieka PAN,
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań.*