

JERZY BAL , DOROTA MACIEJKO
Instytut Matki i Dziecka
Zakład Genetyki
Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa

MUKOWISCYDOZA — OD GENU DO TERAPII

WSTĘP

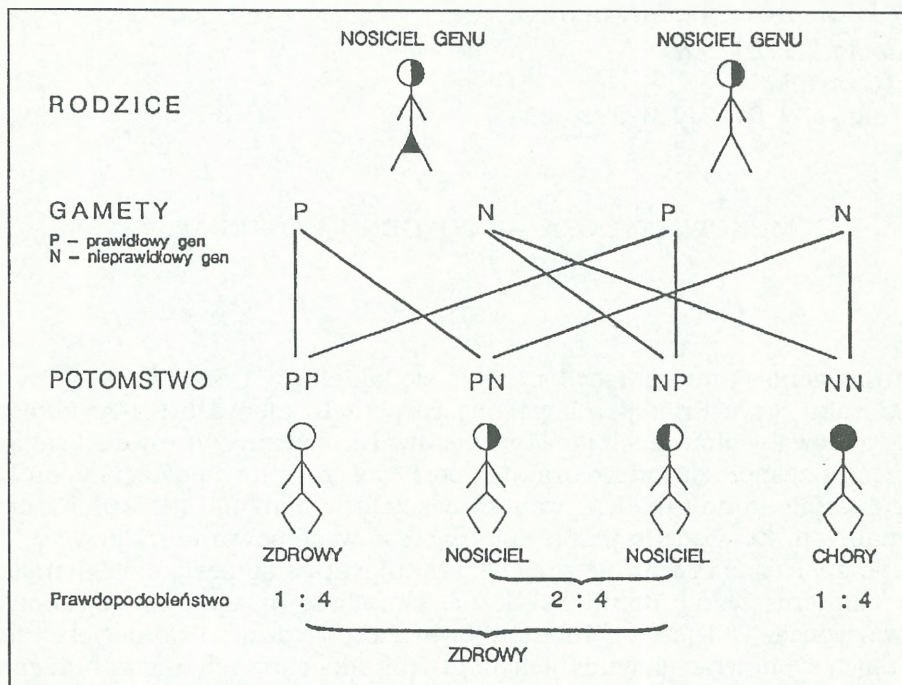
Terapia genowa mukowiscydozy stała się faktem. W USA i Wielkiej Brytanii w 1993 roku a we Francji rok później rozpoczęto pierwsze próby kliniczne. Terapię genową w chorobach genetycznie uwarunkowanych prowadzi się obecnie jeszcze w zespole złożonego braku odporności i rodzinnej postaci hypercholesterolemii. Zgłoszono projekty prób klinicznych w hemofilii i kilku chorobach lizosomalnych. Ze względu jednak na częstość występowania mukowiscydozy, jej skutki społeczne i związane z nią spektakularne osiągnięcia biologii molekularnej, zainteresowanie opinii publicznej skupia się właśnie na tej chorobie. Mukowiscydoza (CF) jest ogólnoustrojową chorobą dzieci i dorosłych, charakteryzującą się nawracającymi infekcjami dróg oddechowych oraz zaburzeniami procesów trawienia. Patologiczne wytwarzanie gęstego śluzu stanowi w przypadku zalegania w drogach oddechowych podłoże dla infekcji bakteryjnych i jest przyczyną blokowania przewodów wyprowadzających gruczoły wydzielania zewnętrznego. Sukcesem opieki medycznej jest obserwowane przedłużenie życia chorych na mukowiscydozę. Staje się ona nie tylko chorobą dzieci, a także dorosłych.

Mukowiscydoza jest chorobą znaną od setek lat. Informacje o chorobie, występowaniu której towarzyszy słony pot — jedna z cech charakterystycznych dla mukowiscydozy, można odnaleźć już w piśmiennictwie epoki średniowiecza. Dopiero jednak lata trzydzieste XX wieku przyniosły dokładniejszy opis choroby, a ostatnie osiągnięcia genetyki stwarzają nadzieję na skuteczną terapię. W Polsce mukowiscydoza bywa opisywana jako torbielowate zwyrodnienie trzustki. W piśmiennictwie anglosaskim jest znana pod nazwą cystic fibrosis.

ZASADY DZIEDZICZENIA

Mukowiscydoza jest chorobą genetycznie uwarunkowaną, dziedziczącą się w sposób klasyczny, zgodnie z prawami Mendla. Za wystąpienie choroby są

odpowiedzialne mutacje w genie *CFTR*, zlokalizowanym w chromosomie siódmym. Mukowiscydoza ujawnia się wyłącznie u tych osób, u których mutacje występują w obu kopiach genu *CFTR*. Osoby z jedną kopią genu o nie zmienionej sekwencji (tak zwaną gen dziki) i jedną kopią genu *CFTR* z mutacją nie wykazują



Rys. 1. Dziedziczenie autosomalne recesywne.

objawów choroby, ponieważ gen dziki dominuje nad genem z mutacją. Osoby o takim genotypie „przenoszą” jedynie zmutowany gen *CFTR*.

Fakt wystąpienia choroby u dziecka określa daną rodzinę jako grupę ryzyka genetycznego, a prawdopodobieństwo urodzenia kolejnego dziecka z mukowiscydozą wynosi 25%. Zarówno ojciec, jak i matka są bowiem nosicielami zmutowanego genu *CFTR*. Na kilkadziesiąt tysięcy przebadanych w świecie rodzin, w których wystąpiła mukowiscydoza tylko raz wykazano, że choroba była spowodowana przez nowo powstałą mutację. We wszystkich pozostałych przypadkach chore dziecko odziedziczyło zmutowane kopie genu *CFTR* od swoich rodziców. Zdarza się jednak (do 1994 roku opisano dwa takie przypadki), że obie kopie zmutowanego genu *CFTR* pochodzą tylko od jednego z rodziców — od matki.

EPIDEMIOLOGIA

Mukowiscydoza jest jedną z najczęstszych chorób monogenowych wśród rasy białej, gdzie występuje z częstością około 1 na 2500 żywych urodzeń. 4%–5% tej

populacji to nosiciele mutacji w genie *CFTR*. W innych populacjach mukowiscydoza jest chorobą rzadko spotykaną. Wśród Murzynów w USA występuje z częstością 1 na 17 tys., a wśród Azjatów spotyka się ją jeszcze rzadziej, bo 1 na 90 tys.

Szacuje się, że w roku 1994 żyje na świecie ponad 50 000 ludzi, głównie dzieci, chorych na mukowiscydozę. W Polsce rodzi się rocznie około 200 dzieci dotkniętych tą chorobą. Około dwóch milionów Polaków, w równym stopniu mężczyzn i kobiet, jest nosicielami zmutowanego genu *CFTR*.

GEN *CFTR* — JEGO FUNKCJA I STRUKTURA

W 1985 roku dość przypadkowo określono w długim ramieniu chromosomu 7 przybliżone położenie genu, którego defekt jest odpowiedzialny za wystąpienie mukowiscydozy. W cztery lata później gen ten — już o nazwie *CFTR* — został dokładnie zbadany i opisany. Poznano częściowo jego strukturę, określono przybliżoną funkcję kodowanego w nim białka, znaleziono mutacje odpowiedzialne za jego nieprawidłowe działanie.

Sklonowaniu genu *CFTR* towarzyszyła bardzo silna konkurencja dwóch ośrodków: amerykańskiego i brytyjskiego. Anglicy zakończyli współzawodnictwo falstartem. Zespoły naukowców kierowane przez Lap-Chi Tsui z Toronto i Francisca Collins z Michigan zostali nie koronowanymi, póki co, zwycięzcami.

FUNKCJA GENU *CFTR*

Gen *CFTR* koduje białko złożone z 1480 aminokwasów o masie cząsteczkowej około 170 kilodaltonów (kD). Angielska nazwa tego polipeptydu (cystic fibrosis transmembrane regulator, *CFTR*) nawiązuje do funkcji, jaka pierwotnie była mu przypisywana. Obecnie wiadomo, że białko *CFTR* pełni rolę kanału chlorkowego w komórkach nabłonkowych dróg oddechowych i gruczołów wydzielania zewnętrznego.

W strukturze białka *CFTR* wyróżnia się szereg charakterystycznych fragmentów, tak zwanych domen. Pozycję centralną zajmuje domena regulacyjna. Po obu stronach znajdują się domeny wewnątrzłonowe i domeny wiążące nukleotydy. Domeny wewnątrzłonowe zakotwiczą białko w strukturze błony komórkowej, a domeny wiążące nukleotydy i domena regulacyjna są odpowiedzialne za otwieranie i zamykanie kanału, przy czym domena regulacyjna działa jak korek zasłaniający wejście do kanału.

STRUKTURA GENU *CFTR*

Gen *CFTR* jest jednym z większych genów człowieka. Liczy około 250 tysięcy nukleotydów. Dwukrotnie przewyższa go swoją wielkością gen *SCA1*, którego defekt jest odpowiedzialny za ataksję rdzeniowo-mózdkową, a prawie dziesięciokrotnie większy jest gen *DMD*, mutacje którego wywołują dystrofię mięśniową typu Duchenne'a i Beckera.

Budowa genu *CFTR* jest podobna do większości genów ludzkich. W sekwencji nukleotydów genu wyodrębnia się tak zwane eksony i introny. W swej strukturze

gen *CFTR* ma 27 eksonów o wielkości zróżnicowanej od 38 do 724 nukleotydów. Wielkości intronów wahają się natomiast od 1,1 tysiąca do 40 tysięcy nukleotydów. mRNA *CFTR* czyli matryca, z której jest produkowane białko (odzwierciedla gen złożony jedynie z eksonów) stanowi jedynie około 2,5 % całego genu *CFTR*.

Warto może w tym miejscu przypomnieć, że za rozszyfrowanie „nieciągłego” sposobu zapisu informacji genetycznej Sharp i Roberts otrzymali w 1994 roku Nagrodę Nobla.

Typ budowy białka *CFTR* (dwie domeny wewnątrzblonowe, dwie domeny wiążące nukleotydy) sugeruje, że sam gen powstał w wyniku podwojenia fragmentu DNA. Świadczyć o tym może również i to, że w przypadku eksonów kodujących domeny wiążące nukleotydy obserwuje się bardzo wysoką zgodność w sekwencji.

MUTACJE I WARIANTY POLIMORFICZNE GENU *CFTR*

Do końca 1994 roku w genie *CFTR* opisano blisko 500 różnych mutacji odpowiedzialnych za modyfikację lub brak jego funkcji. Większość z nich to mutacje punktowe, zmieniające sens zapisu informacji genetycznej. Oznacza to, że w polipeptydzie, w miejscu odpowiadającym wystąpieniu mutacji, jest wbudowany inny niż normalnie aminokwas. Inny typ mutacji punktowych, również często występujący w genie *CFTR*, tak zwane mutacje nonsens, zatrzymują powstawanie pełnego polipeptydu.

Mutacje typu zmiany sensu stanowią około 45% wszystkich znanych mutacji w genie *CFTR*, mutacje nonsens około 18%, małe insercje/delecje (wstawienie/ubytek) około 23%, a mutacje na złączach intron/ekson, w wyniku których błędnie są wycinane introny, około 14%. W genie *CFTR*, w odróżnieniu do wspomnianego wyżej genu *DMD*, wielkie delecje stanowią rzadkość. Największa znana delecja, około 40 tysięcy nukleotydów obejmuje eksony od 11 do 18.

Rozkład mutacji w genie nie jest równomierny. Większość mutacji koncentruje się w eksonach kodujących domeny wiążące nukleotydy i w domenie regulacyjnej.

Oprócz mutacji w genie *CFTR* opisano szereg tak zwanych wariantów polimorficznych. W ten sposób są określane zmiany w sekwencji nukleotydów, których wystąpienie nie pociąga za sobą zmian w sekwencji aminokwasów. Może tak się zdarzyć, gdyż większość aminokwasów wchodzących w skład białek jest kodowanych przez kilka różnych trójek nukleotydów, stanowiących podstawową jednostkę informacji genetycznej. Różne typy zmian polimorficznych są wykrywane również w sekwencjach genu nie kodujących informacji o białku, na przykład w intronach.

MUTACJA $\Delta F508$

Najczęściej występującą mutacją w genie *CFTR* jest trójnukleotydomowa delecja w eksonie 10. W wyniku tej mutacji z sekwencji nukleotydów zostaje usunięty kodon CTT, a w konsekwencji i aminokwas fenyloalanina w pozycji 508 łańcucha polipeptydowego *CFTR*. Powstający produkt jest krótszy tylko o jeden aminokwas, ale białko nie posiada już zdolności do osiagania w komórce odpowiedniej dla niego lokalizacji.

Mutacja $\Delta F508$ jest odpowiedzialna średnio za około 70% wszystkich mutacji w genie *CFTR*. W częstości jej występowania obserwuje się jednak znaczne różnice geograficzne. Przykładowo częstość występowania delecji $F508$ wśród Turków określono na 30%, a u Duńczyków na blisko 90%. Obserwowany w Europie malejący gradient częstości występowania mutacji $\Delta F508$ z północnego zachodu na południowy wschód stał się podstawą do określenia dróg rozprzestrzenienia się tej mutacji. Uważa się, że mutacja $\Delta F508$ „rozchodziła” się w Europie wraz migracją ludów przybyłych ze wschodu lub z centrum kontynentu.

Badania genu *CFTR* przeprowadzone u Basków, najstarszej powstałej w paleolicie populacji europejskiej wskazują, że mutacja ta istniała już wtedy w tej populacji. Szacuje się, że mutacja $\Delta F508$ powstała nie później niż 53000 lat temu. Takie określenie czasu powstania mutacji jest możliwe na podstawie prześledzenia rodzaju i tempa zmian mutacyjnych i polimorficznych w danej sekwencji nukleotydów w DNA.

Większość z pozostałych blisko 500 mutacji opisanych dla genu *CFTR* to mutacje rzadkie, specyficzne dla danej rodziny. Pewnym wyjątkiem są mutacje, charakterystyczne dla grupy etnicznej populacji, to znaczy występujące w niej z dużo większą częstością niż gdzie indziej. Swoiste mutacje, których częstość występowania przekracza 5%, stwierdzono u Francuzów z Quebecu, Żydów Aszkenazyjskich, czy populacji pochodzenia celtyckiego w Irlandii i Szkocji.

CZĘSTOŚĆ MUTACJI W GENIE *CFTR* W POLSCE

Badania molekularne w kierunku mukowiscydozy w Polsce są prowadzone zasadniczo w dwóch ośrodkach: w Instytucie Matki i Dziecka w Warszawie i w Zakładzie Genetyki Człowieka w Poznaniu. W obu tych ośrodkach rutynowo identyfikuje się najczęściej występujące mutacje w genie *CFTR*. Przeprowadzone do tej pory badania dla ponad 300 chorych na mukowiscydozę wskazują, że obecnie jest możliwa identyfikacja niespełna 70% wszystkich mutacji w tym genie (mutacja $\Delta F508$ jest w Polsce odpowiedzialna za 54% defektów w genie *CFTR*).

GENOTYP A FENOTYP

Zaproponowany ostatnio podział mutacji w genie *CFTR* obejmuje zarówno rodzaj zmiany molekularnej, jak i spodziewane konsekwencje komórkowe. Pierwsza kategoria mutacji to te, które wpływają na produkcję białka. Zalicza się do nich głównie mutacje typu nonsens, w wyniku których obserwuje się całkowity brak białka lub też obecność jedynie fragmentu polipeptydu kodowanego w genie *CFTR*. Kategoria druga, to mutacje zakłócające zdolność do właściwej lokalizacji białka w komórce. Kategoria trzecia to mutacje zmieniające regulację, a kategoria czwarta zmieniające specyficzność kanału chlorkowego.

Spośród opisanych wyżej klas mutacji wydzielono mutacje „silne” i „łagodne”. Mutacje „silne” koncentrują się w eksonach kodujących domeny wiążące nukleotydy i przeważnie zaliczają się do kategorii mutacji decydujących o produkcji białka lub jego właściwej lokalizacji w komórce (na przykład mutacja $\Delta F508$). Towarzyszące im ostre objawy kliniczne ze strony trzustki i dróg oddechowych

decydują o szczególnie ciężkim przebiegu choroby. Grupa mutacji „łagodnych” skupia z reguły mutacje zmieniające specyficzność działania kanału chlorkowego. Towarzyszą im niewielkie zmiany płucne, a choroba z reguły jest wykrywana w późniejszym wieku.

Jak zaznaczono wcześniej, mukowiscydoza jest uwarunkowana wystąpieniem mutacji w obu kopiach genu *CFTR*. Badania prowadzone w ponad 100 ośrodkach w wielu krajach świata umożliwiają obecnie stwierdzenie, że w układzie mutacja „silna”/mutacja „łagodna” efekt tej drugiej jest dominujący.

Na przedstawiony wyżej obraz ekspresji poszczególnych mutacji nakładają się również inne mechanizmy molekularne. Okazuje się bowiem, że nie bez znaczenia jest „tło genetyczne”, na jakim występuje określona mutacja. Poprzez „tło” określa się zmiany polimorficzne występujące w otoczeniu danej mutacji. Podkreśla to złożoność korelacji fenotyp — genotyp.

NIETYPOWE FORMY MUKOWISCYDOZY

Jedną z cech klinicznych, charakterystycznych dla mukowiscydozy, jest bezpłodność mężczyzn. Z pewnym zaskoczeniem przyjęto wyniki badań molekularnych, prowadzonych w klasyfikowanym jako oddzielna jednostka chorobowa, wrodzonym braku nasieniowodów. Okazało się bowiem, że u ponad 60% mężczyzn z tym zespołem stwierdza się występowanie mutacji typu $\Delta F508$, z czego u 1/10 wykryto równocześnie inną mutację (z kategorii „łagodnych”) w drugiej kopii genu *CFTR*.

Występowanie mutacji w genie *CFTR* opisano również dla kilku innych zespołów. Być może jest zasadne klasyfikowanie wszystkich tych zespołów jako mukowiscydozy z różnym stopniem nasilenia określonych objawów klinicznych.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA

Obraz kliniczny decyduje o rozpoznaniu mukowiscydozy. Różne typy testów trzustkowych, ocena zmian płucnych, czy określanie stężenia chlorków w pocie są w dalszym ciągu podstawowymi kryteriami diagnostycznymi. Pamiętać jednak należy, że poszczególne objawy, jak chociażby słony pot towarzyszą i innym schorzeniom, na przykład mukopolisacharyozom, hypotyroidyzmowi czy dysplazji ektodermalnej oraz, że opisano szereg przypadków mukowiscydozy, gdzie stężenie elektrolitów nie odbiegało od normy.

ANALIZA DNA W DIAGNOSTYCE

Szczególne miejsce w rozwoju technik biologii molekularnej, przypada technice łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR), która swojemu wynalazcy Ch. Mullis'owi przyniosła w 1994 roku Nagrodę Nobla. Dzięki reakcji PCR istnieje możliwość analizy DNA, źródłem którego jest, na przykład, pojedyncza komórka włosa czy fragmenty zmumifikowanych tkanek.

Przy identyfikacji mutacji w genie *CFTR* stosuje się różne metody badawcze. We wszystkich tych technikach pierwszym etapem jest jednak zawsze powielenie specyficznego fragmentu DNA w reakcji PCR.

WERYFIKACJA ROZPOZNANIA KLINICZNEGO

Tak jak i w innych chorobach dziedzicznych pełna weryfikacja rozpoznania klinicznego jest możliwa tylko na poziomie molekularnym. W mukowiscydozie taką weryfikację zapewnia identyfikacja mutacji w obu kopiach genu *CFTR*. W populacji polskiej weryfikacja rozpoznania możliwa jest dla około połowy diagnozowanych przypadków. Wynika to ze stosunkowo niskiej, poniżej 70%, częstości wykrywania mutacji w genie *CFTR*.

BADANIE NOSICIELSTWA MUTACJI W GENIE *CFTR*

Oprócz weryfikacji rozpoznania klinicznego analiza DNA umożliwia ustalenie nosicielstwa zmutowanego genu. Pierwszym etapem badania nosicielstwa jest zawsze próba identyfikacji mutacji. W przypadku jednak, gdy nie udaje się zidentyfikować mutacji, jest możliwe tak zwane badanie rodzinne. W analizie tej korzysta się z markerów genetycznych, którymi z reguły są zmiany polimorficzne zlokalizowane blisko lub wewnątrz genu *CFTR*. Metoda zakłada wspólne dziedziczenie (sprzężenie) danego markera z mutacją w genie *CFTR*. Prześledzenie sposobu dziedziczenia się analizowanych markerów zarówno od strony matki, jak i ojca chorego „przekłada” się na sposób dziedziczenia zmutowanego genu, co stwarza możliwość ustalenia nosicielstwa w badanej rodzinie. Ten typ analizy DNA nie weryfikuje rozpoznania klinicznego, ponieważ na nim właśnie bazuje. Analiza sprzężonych z genem markerów może być wykorzystywana również w diagnostyce prenatalnej choroby.

DIAGNOSTYKA PRENATALNA

Do czasu wprowadzenia do diagnostyki mukowiscydozy analizy DNA przeprowadzenie badania prenatalnego było możliwe dopiero w trzecim trymestrze ciąży. Wykorzystywano w nich wykazaną korelację pomiędzy obecnością mukowiscydozy u płodu a obniżeniem poziomu niektórych enzymów jelitowych w płynie owodniowym, uzyskanych drogą amniopunkcji. Po wprowadzeniu technik molekularnych metoda ta, obarczona dość dużym błędem, została prawie całkowicie zaniechana.

Badanie molekularne, zarówno identyfikacja mutacji, jak i analiza markerów polimorficznych, jest możliwe już w pierwszym trymestrze ciąży. Ryzyko poronienia związane z pobraniem materiału jest porównywalne do amniopunkcji i wynosi 1%–2%. Badania prenatalne w mukowiscydozie są wykonywane w Polsce bardzo rzadko. Przykładowo na przestrzeni ostatnich pięciu lat analizę DNA w badaniu prenatalnym wykonano jedynie w 11 przypadkach.

Możliwości jakie dają techniki biologii molekularnej wydają się być nieograniczone. Opisano, na przykład, diagnostykę preimplantacyjną mukowiscydozy, podczas której wykonano identyfikację mutacji $\Delta F508$ analizując DNA wyizolowany z pojedynczej komórki czterokomórkowego ludzkiego zarodka.

LECZENIE

Leczenie mukowiscydozy wymaga działań kompleksowych i jest w dalszym ciągu leczeniem typu objawowego. Do leczenia typu podstawowego należy zaliczyć przede wszystkim stosowanie diety wysokoenergetycznej, zabezpieczającej organizm przed wyniszczeniem. W przypadku niedoboru enzymów trzustkowych podaje się odpowiednie preparaty enzymatyczne, a w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych jest stosowana antybiotykoterapia. Ważne miejsce przypada fizykoterapii, która obejmuje terapię inhalacyjną i drenaż oskrzeli, w czasie którego usuwa się zalegającą w drogach oddechowych wydzielinę. Przeszczep płuc czy też płuco-serca, stosowany w zasadzie wyłącznie w USA w bardzo zaawansowanych przypadkach mukowiscydozy, trudno zaliczyć do metod rutynowych.

NOWE KONCEPCJE TERAPEUTYCZNE

Zasługujące na uwagę nowe koncepcje farmakologiczne koncentrują się przede wszystkim na upłynnieniu śluzu, zalegającego drogi oddechowe chorych na mukowiscydozę. Również na tym polu można mówić o osiągnięciach inżynierii genetycznej. Jednym z głównych składników śluzu jest DNA, pozostałość po leukocytach zaangażowanych w zwalczanie infekcji bakteryjnych. Od niedawna stosowany enzym DNaza, fragmentując DNA nawet do pojedynczych nukleotydów przyczynia się do zmniejszenia lepkości i łatwiejszego wydalania śluzu. Preparat ten podaje się chorym donosowo, w postaci aerozolu. Otrzymuje się go w procesie biotechnologicznym, w którym pierwszym etapem było wyodrębnienie ludzkiego genu. Innym bioproduktem, znajdującym zastosowanie w leczeniu chorych na mukowiscydozę, jest ludzka α_1 -antytrypsyna, zmniejszająca stan zapalny dróg oddechowych. Upłynnianie śluzu osiąga się również na drodze podawania diuretyku, jakim jest amylorid. Blokując pobieranie jonów sodowych przyczynia się on do większego uwodnienia śluzu.

Opisane wyżej nowe sposoby terapii nie przynoszą pełnego powrotu do zdrowia i są niestety bardzo drogie. Przykładowo roczne leczenie preparatem DNAzy, poprawiające usuwanie śluzu z dróg oddechowych, kosztuje ponad 10000 dol. USA. Fakty te dodatkowo zintensyfikowały zainteresowanie i nadzieje, jakie łączy się z terapią genową mukowiscydozy.

SOMATYCZNA TERAPIA GENOWA

Sklonowanie genu *CFTR* stało się sygnałem dla podjęcia prób w kierunku terapii genowej mukowiscydozy. Szybko wykazano, że „sztuczny” gen (dokładniej cDNA genu *CFTR* — czyli sekwencja genu pozbawiona intronów, odpowiadająca jego mRNA) jest zdolny do ekspresji białka CFTR w hodowlach tkankowych oraz, że tylko 6%–8% normalnego poziomu mRNA wystarcza do pełnego zrekompensowania skutków mutacji. Sprzyjającą okolicznością była również możliwość podawania genu bezpośrednio do tkanek nabłonkowych dróg oddechowych, na przykład poprzez inhalację odpowiednio przygotowaną mieszaniną aerozolu.

Opisywana w tym artykule terapia genu mukowiscydozy jest typem leczenia zachowawczego. „Naprawie” nie ulegają bowiem linie płciowe, będące źródłem komórek rozrodczych. Kobiety (mężczyźni z mukowiscydozą są niepłodni) mogą przekazywać więc zmutowane geny *CFTR* następnemu pokoleniu. Faktyczny efekt wyleczenia mukowiscydozy można by osiągnąć w tak zwanej terapii germinacyjnej (tj. manipulacji genetycznych w komórkach rozrodczych lub pierwszych stadiach zarodka). W wielu krajach ten typ manipulacji genetycznych jest jednak zabroniony.

Od samego początku eksperymentów z somatyczną terapią genową ukształtowały się dwie koncepcje podawania genu. Francuzi i Amerykanie zaproponowali użycie jako nośnika odpowiednio zmodyfikowanego adenowirusa wykorzystując jego naturalne powinowactwo do komórek nabłonkowych wyścielających drogi oddechowe. Pomysł Brytyjczyków polegał na wykorzystaniu jako nośnika liposomów. Zanim przystąpiono do prób klinicznych, wykonano jednak szereg eksperymentów na zwierzętach.

MODEL ZWIERZĘCY

Niektóre ze znanych u ludzi chorób genetycznych mają swoje naturalne odpowiedniki wśród zwierząt. Tak zwany królik Watanabe to królik z hypocholesterolemią rodzinną (defekt genu kodującego receptor *LDL*). Seter irlandzki z defektem genu kodującego czynnik VIII to model dla hemofilii A.

Mukowiscydoza nie ma swojego naturalnego modelu zwierzęcego, należało go więc skonstruować. Gen *cfr* u myszy sklonowano wkrótce po sklonowaniu genu człowieka. Około 80% sekwencji obu genów okazało się być identyczne, a w niektórych eksonach zgodność przekraczała 90%. Kolejnym etapem w konstrukcji modelu zwierzęcego mukowiscydozy było wprowadzenie mutacji do mysiego genu *cfr*. Doświadczenia tego typu wykonano w kilku różnych laboratoriach. Okazało się, że w zależności od zastosowanej techniki unieczynienia genu, myszy różniły się cechami klinicznymi. Dominującą cechą u myszy z defektem obu kopii genu *cfr* były objawy ze strony przewodu pokarmowego. Objawy płucne, tak niebezpieczne dla życia ludzi, u myszy prawie zupełnie nie występowały. Niemniej stworzony został model zwierzęcy dla eksperymentalnej terapii genowej.

Doświadczenia na zwierzętach wykazały, że gen *CFTR*, podany drogą inhalacyjną do komórek nabłonkowych ulega pełnej ekspresji oraz że zarówno wirusy, jak i liposomy nie stanowią zagrożenia dla człowieka. Jedynym utrudnieniem, charakterystycznym dla obu nośników była konieczność podawania nowego preparatu genu *CFTR* w odstępach kilkutygodniowych, gdyż był naturalnie eliminowany z organizmu wraz ze złuszczaćcym się nabłonkiem.

PRÓBY KLINICZNE

Pierwsze podanie genu *CFTR* osobie chorej na mukowiscydozę miało miejsce w USA w kwietniu 1993 roku. Po uzyskaniu zgody amerykańskiego Narodowego Instytutu Zdrowia (NIH) w zespole R. Crystala wprowadzono w adenowirusie funkcjonalny gen *CFTR* 23-letniemu mężczyźnie z zaawansowaną mukowiscydozą, u którego wykryto dwie mutacje $\Delta F508$. W tym samym roku Brytyjczycy

podali liposomy z genem *CFTR* grupie dziewięciu chorych. Pierwsze próby kliniczne koncentrują się na określeniu dawki genu i bezpieczeństwa terapii. Zarówno w przypadku terapii, gdzie nośnikiem genu *CFTR* jest adenowirus, jak i w przypadku liposomów nie stwierdzono żadnych skutków ubocznych. Wstępne wyniki badań elektrochemicznych wskazują na wzrost przewodnictwa jonów chlorkowych. Brak jest informacji przesadzających o powodzeniu lub też niepowodzeniu tak prowadzonej terapii genowej.

Próby kliniczne z terapią genową w mukowiscydozie prowadzi kilka zespołów amerykańskich, jedna grupa w Wielkiej Brytanii i jedna we Francji (od 1994 r.). Rozwijane są nowe typy nośników wirusowych dla genu *CFTR*. Myśli się jednak i o innych typach leczenia. Jeden z projektów przewiduje podawanie chorym w liposomach nie genu a samego białka *CFTR*.

ZAKOŃCZENIE

Wiedza o podłożu molekularnym mukowiscydozy stała się podstawą do wprowadzania terapii genowej w leczeniu tej choroby. Nie znaczy to jednak, że wszystkie zagadki zostały rozwiązane. Bez odpowiedzi pozostaje na przykład pytanie, jaki czynnik selekcyjny doprowadził do tak wysokiej częstości występowania w populacji ludzkiej mutacji w genie *CFTR*? Najbardziej przekonująca z teorii próbuje łączyć nosicielstwo mutacji w tym genie z odpornością na biegunki wywołwane przez bakterie jelitowe, na przykład niektóre szczepy *Escherichia coli*. Główną przyczyną śmiertelności powodowaną przez biegunki jest odwodnienie organizmu. Nosiciele mutacji, u których wpływ jonów chlorkowych wraz z wodą jest znacznie obniżony, byłiby więc na te biegunki bardziej odporni niż osoby, u których obie kopie genu *CFTR* funkcjonują normalnie. Dlaczego jednak wysoka częstość mutacji w genie *CFTR* jest cechą jedynie populacji białej trudno w dalszym ciągu wyjaśnić.

Dzięki osiągnięciom biologii molekularnej stale powiększa się grupa chorób genetycznie uwarunkowanych, których leczenie staje się możliwe. Również w profilaktyce tych chorób, w której do niedawna jedyną możliwością była rezygnacja z prokreacji, obserwuje się znaczący postęp. Przykładem profilaktyki pierwotnej, to znaczy zapobiegającej wystąpieniu danej wady, jest podawanie kobietom w okresie przedkoncepcyjnym i po zajściu w ciążę wysokich dawek kwasu foliowego. Jak wykazano w około 70% przypadków redukuje to możliwość wystąpienia u płodu wady cewy nerwowej.

Typem działań profilaktycznych są badania przesiewowe umożliwiające identyfikację nosicieli zmutowanego genu. Jak się okazuje, fakt ustalenia nosicielstwa danej mutacji w połączeniu z nowoczesnymi możliwościami diagnostycznymi może przynieść zaskakujący rezultat. Zainicjowane w 1970 roku badania przesiewowe w chorobie Tay-Sachsa i β -talasemii po 20 latach przyniosły 20-krotną redukcję występowania obu chorób w populacjach objętych badaniami.

W mukowiscydozie badania przesiewowe w kierunku nosicielstwa mutacji w genie *CFTR* są w pełni możliwe i opłacalne w populacjach, dla których poziom wykrywalności mutacji jest wysoki. W pozostałych, w tym w Polsce, społeczność

naukowa apeluje o prowadzenie tego typu badań, przynajmniej w rodzinach ryzyka genetycznego.

W wielu krajach rodziny ryzyka genetycznego skupiają się w Towarzystwach Chorych na Mukowiscydozę. Towarzystwa te popularyzują wiedzę o chorobie, metodach jej leczenia i diagnostyki, wydają własne czasopisma i informatory, organizują pomoc socjalną. W krajach zachodnich, szczególnie w USA, Towarzystwo Rodzin CF stanowi niebagatelną grupę nacisku na administrację lokalną i federalną, finansując w znacznym stopniu również badania naukowe. W Polsce, w Rabce od kilku lat działa towarzystwo o podobnym profilu. Działa również Polska Grupa Robocza Mukowiscydozy skupiająca lekarzy różnych specjalności, rehabilitantów i biologów zajmujących się między innymi diagnostyką molekularną tej choroby.

Chcielibyśmy bardzo serdecznie podziękować Panu Docentowi Tadeuszowi Mazurczakowi oraz Kolegom z Zakładu Genetyki Instytutu Matki i Dziecka za cenne uwagi, którymi służyli nam w czasie pisania tego artykułu.

CYSTIC FIBROSIS FROM GENE TO THERAPY

Summary

The aim of this presentation is to summarize the recent knowledge about cystic fibrosis, one of the most common autosomal recessive genetic disorders which occurs in Caucasians. Molecular basis of the disease and diagnostic possibilities are presented. The recent trends in the treatment of cystic fibrosis patients including somatic gene therapy are discussed.

LITERATURA

- BAL J., 1991. *Molekularne podłoże mukowiscydozy*. Postępy Biochemii 37, 153–158.
- SKIBIŃSKA A., WITT M., 1992. *Molekularne podstawy mukowiscydozy*. Postępy Biologii Komórki 19, 263–273.
- MIDRO A. T., KULCZYŃSKI L. L., ŚLEDZIEWSKI A., 1993. *Perspektywy zastosowania terapii genowej w mukowiscydozie*. Post. Hig. Med. Doś. 47, 221–230.
- TYRAKOWSKI T., 1993. *Prawidłowa i zaburzona funkcja kanału chlorkowego CFTR — biochemiczna analiza mukowiscydozy*. Postępy Biochemii 39, 25–32.
- BAL J., 1994. *Mukowiscydoza — podstawy wprowadzenia somatycznej terapii genowej*. Postępy Biochemii 40, 86–90.