

Panu Profesorowi Lechowi Wojtczakowi z okazji siedemdziesiątej rocznicy urodzin z wyrazami najgłębszego szacunku, uznania i sympatii oraz z najlepszymi życzeniami

JULIAN ŚWIERCZYŃSKI, ZDZISŁAW KOCHAN, JOANNA KARBOWSKA

*Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku
Dębinki 1, 80-211 Gdańsk*

BIOLOGIA MOLEKULARNA I JEJ ZASTOSOWANIE W MEDYCYNIE

Niezwykle szybki rozwój biologii molekularnej spowodował, że dziedzina ta wkracza w podstawowe obszary działalności lekarza praktyka. Techniki biologii molekularnej znajdują zastosowanie w diagnostyce i leczeniu chorób, transplantologii, medycynie sądowej, a ostatnio sugeruje się, że biologia molekularna odegra istotną rolę w profilaktyce niektórych chorób (HARGRST i WILLIAMSON 1996).

Przedstawienie zagadnień związanych z zastosowaniem biologii molekularnej w medycynie wymaga omówienia kilku podstawowych kwestii związanych z budową cząsteczki DNA. Dwa pasma tej cząsteczki są połączone wiązaniami wodorowymi pomiędzy adeniną a tyminą oraz guaniną a cytozyną. Ludzki genom haploidalny zawiera około $3,3 \times 10^9$ par zasad. Gdyby DNA występujący w jądrze komórkowym był liniowo rozciągnięty, miałby kilka metrów długości. W jądrze komórkowym DNA jest upakowany w zwarte struktury głównie z udziałem zasadowych białek zwanych histonami. Zakładając, że przeciętny gen składa się z 3×10^3 par zasad, łatwo wyliczyć, że genom ludzki powinien składać się z około 1 miliona genów (przyjmując, że geny nie nakładają się oraz że transkrypcja przebiega tylko w jednym kierunku). Szacuje się jednak, że u człowieka jest około 100 tys. genów, co oznacza, że zaledwie około 10% DNA koduje białka. Funkcja pozostałych 90% ludzkiego genomu nie jest do tej pory znana (EMERY i MALCOLM 1995).

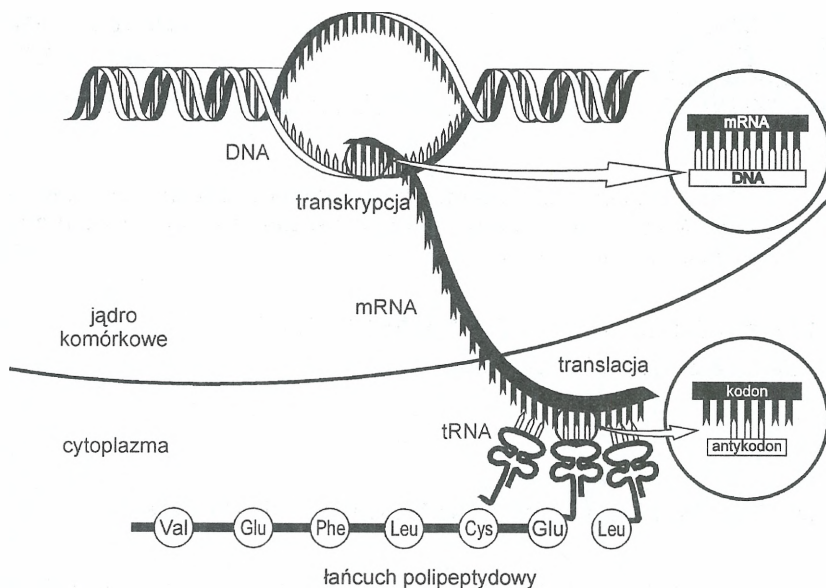
Tworzenie par zasad jest bardzo istotne dla utrzymania przestrzennej struktury DNA. Odgrywa ono ważną rolę w procesach replikacji, transkrypcji i translacji (ryc. 1), stanowi również podstawę procesu zwanego hybrydyzacją czyli swoistą reasocjacją komplementarnych pasm kwasów nukleinowych (zarówno DNA, jak

i RNA). Hybrydyzacja i tak zwane techniki przenoszenia plam — przenoszenie metodą Southern (DNA) i metodą Northern (RNA) — pozwalają na identyfikację i ilościowe oznaczanie określonych fragmentów kwasów nukleinowych (EMERY i MALCOLM 1995).

Ważnym wydarzeniem w biologii molekularnej było odkrycie i praktyczne zastosowanie enzymów restrykcyjnych. Enzymy te, wyizolowane z komórek bakteryjnych, hydrolizują DNA (zarówno pochodzenia bakteryjnego, jak i zwierzęcego) w swoistych sekwencjach w obrębie cząsteczki. Zastosowanie enzymów restrykcyjnych umożliwia otrzymanie ściśle określonych fragmentów DNA, jak również pozwala na badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) oraz wykrywania mutacji (ryc. 2), co już znalazło zastosowanie w medycynie (EMERY i MALCOLM 1995).

Metodą, która w znacznym stopniu przyczyniła się do rozwoju biologii molekularnej i znajduje zastosowanie w medycynie jest łańcuchowa reakcja polimerazy. Metoda ta służy do amplifikacji określonych sekwencji DNA. Użycie dwóch swoistych starterów oligonukleotydowych, które hybrydują z komplementarnymi do nich sekwencjami położonymi na przeciwnych pasmach DNA i ograniczają (flankują) badaną sekwencję pozwala na powielenie tej sekwencji. Wielokrotnie powtarzane cykle denaturacji cieplnej, łączenia starterów z sekwencjami komplementarnymi matrycy oraz wydłużania starterów przez stabilną termicznie polimerazę DNA (polimerazę izolowaną z *Thermus aquaticus*, bakterii, która żyje w temperaturze około 80°C) dają ostatecznie eksponencjalną amplifikację fragmentów DNA o ściśle określonej długości (ryc. 3) (EMERY i MALCOLM 1995).

Wymienione metody oraz szereg innych technik pozwalają na identyfikację, izolację i



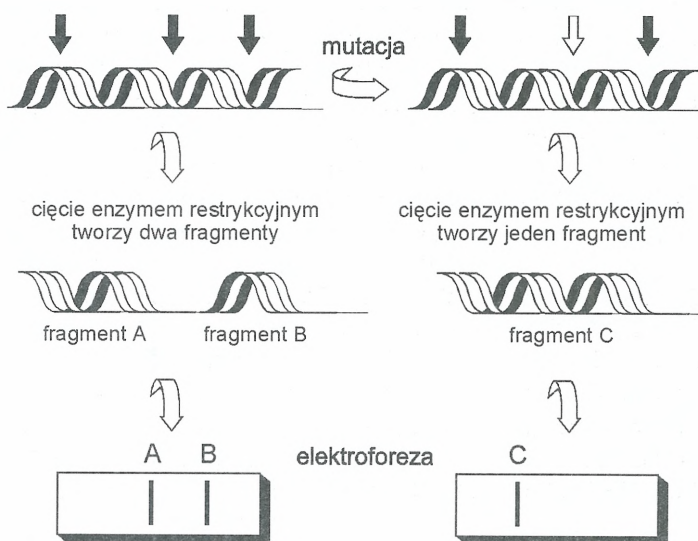
Ryc. 1. Udział wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi zasadami purynowymi i pirymidynowymi w procesach transkrypcji i translacji.

szczegółową charakterystykę genu. Tak scharakteryzowany gen można wprowadzić do zwierzęcych (w tym ludzkich) komórek rozrodczych (ze względów głównie etycznych tego typu doświadczeń nie przeprowadza się na ludziach) lub somatycznych (podstawowe postępowanie w terapii genowej). W celu produkcji określonych białek (w tym również leków) wprowadza się geny do komórek bakteryjnych i owadów (EMERY i MALCOLM 1995).

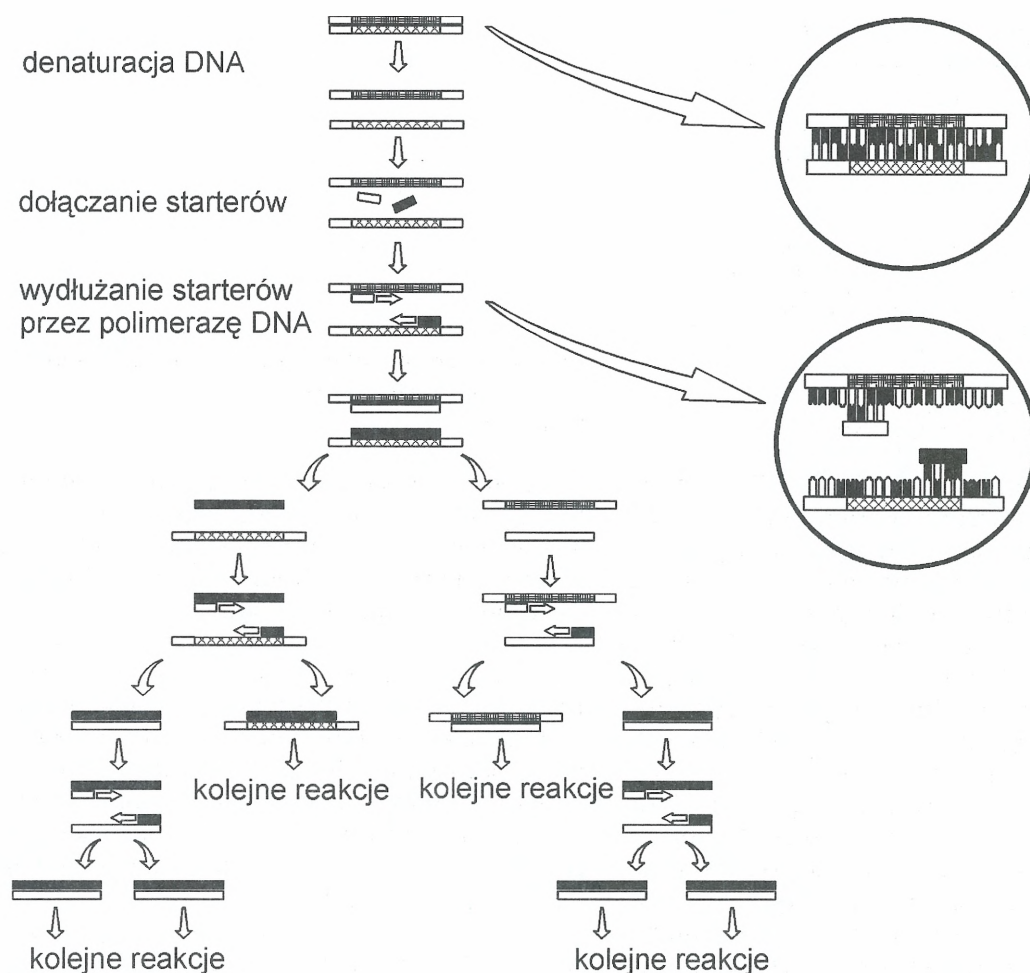
Dostępne techniki biologii molekularnej umożliwiają diagnozowanie trzech grup chorób: dziedzicznych (przykłady przedstawione w tabeli 1, MILLER 1990, MEAGER i GRIFFITHS 1994), zakaźnych (przykłady podane w tabeli 2, GILBOA i SMITH 1994) i chorób uwarunkowanych wieloczynnikowo (np. choroby nowotworowe i układu krążenia; MASTRANGELO i współaut. 1996, NABEL i współaut. 1994). W przypadku chorób dziedzicznych badanie polega na wykazaniu zmian genu powodujących chorobę. Diagnostyka chorób zakaźnych polega na identyfikacji

materiału genetycznego (DNA lub RNA) określonego patogenu (bakterii, wirusa, grzyba, pierwotniaka) w materiale pochodzącym od pacjenta.

Bardziej skomplikowana jest diagnostyka molekularna chorób nowotworowych. Wiadomo, że bezpośrednią przyczyną tych chorób jest uszkodzenie cząsteczki DNA przez różne czynniki genotoksyczne. Przyjmuje się, iż ma to miejsce w 80%–90% przypadków chorób nowotworowych. Szczególnie mutacje w obrębie protoonkogenów i genów supresorowych (zwanych również antyonkogenami) mogą stać się przyczyną procesu nowotworowego. Protoonkogeny występują w normalnych komórkach i kodują białka regulujące prawidłowy wzrost i różnicowanie komórek. Z kolei geny supresorowe kodują białka wspomagające regulację wzrostu i różnicowania komórek. Skoordynowane współdziałanie protoonkogenów i genów supresorowych jest warunkiem prawidłowego wzrostu i różnicowania komórek (ryc. 4). Mutacje prowadzą do przekształcania protoonkogenów w on-



Ryc. 2. Działanie enzymów restrykcyjnych na fragment DNA prawidłowego i DNA, który uległ mutacji w miejscu działania enzymu restrykcyjnego.



Ryc. 3. Zasada powielania DNA metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR).

kogeny, w wyniku czego dochodzi do wzmożonej syntezy białek (np. cyklin) regulujących wzrost i różnicowanie komórek. Mutacje w obrębie genów supresorowych prowadzą do zahamowania syntezy białek wspomagających regulację wzrostu i różnicowania komórek. W ten sposób dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy onkogenami a antyonkogenami, czego konsekwencją jest zwiększone prawdopodobieństwo transformacji nowotworowej (ryc. 5). Obecnie jest znanych około 100 różnych onkogenów, z których tylko kilkanaście jest bezpośrednio związanych z chorobami nowotworowymi (MASTRANGELO i współaut. 1996). Funkcje niektórych z nich przedstawiono w tabeli 3.

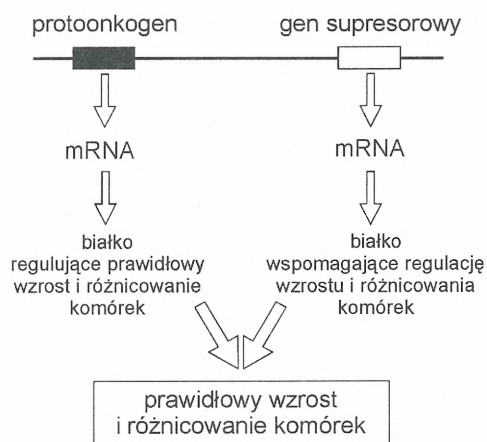
Mechanizm działania onkogenów jest bardziej skomplikowany niż to przedstawiono na rycinach 4 i 5. W dużym uproszczeniu polega on na interakcji produktu onkogenu z odpowiednim receptorem błonowym. Uruchamia to kaskadę procesów biochemicznych w cytosolu i jądrze komórkowym, co w konsekwencji prowadzi do wzmożonej ekspresji białek regulujących podziały komórkowe na przykład cyklin (KRONTRIS 1995).

Mechanizm działania antyonkogenów omówiono na przykładzie antyonkogeny p53

Tabela 1. Niektóre choroby dziedziczne diagnozowane za pomocą technik biologii molekularnej

Choroba	Białko
Ciężki złożony zespół niedoboru odporności*	deaminaza adenozyliny
Mukowiscydoza	CFTR — białko pełniące funkcje kanału chlorkowego
Rodzinna hipercholesterolemia	receptor LDL
Hemofilia a	czynnik VII
Hemofilia b	czynnik IX
Fenyloketonuria	hydroksylaza fenyloalaniny
Choroba Gauchera	glukocerebrozydaza
Zespół Lesch-Nyhana	fosforybozylotransferaza hipoksantynowa
Dystrofia mięśniowa Duchenna	dystrofina — białko, którego brak prowadzi do wystąpienia dystrofii mięśniowej
Anemia złośliwa	β -globina

*W przypadku tej choroby w 1990 roku przeprowadzono w USA pierwszą próbę terapeutyczną polegającą na wprowadzeniu genu kodującego ludzką deaminazę adenozyliny do genomu limfocytów T pacjenta.



(ryc. 6). W wyniku uszkodzenia DNA przez czynniki genotoksyczne, wzrasta stężenie produktu tego genu, czyli białka p53. Przypuszcza się, że białko to hamuje podziały komórek, tak aby systemy naprawcze komórki mogły dokonać naprawy uszkodzonego DNA. Jeśli uszkodzenie DNA jest zbyt duże i niemożliwa jest jego naprawa, wtedy *p53* aktywuje proces apoptozy (genetycznie programowanej śmierci komórki), eliminując w ten sposób te komórki, które zawierają uszkodzony DNA. Mutacja genu *p53*, powoduje, że pomimo uszkodzeń DNA podziały komórek nie są zahamowane. Nie obserwuje się również stymulacji apoptozy. Prowadzi to do wzrostu żywotności komórek i częstości mutacji, czego konsekwencją jest zwiększone prawdopodobieństwo transformacji nowotworowej (DONEYOWER 1994).

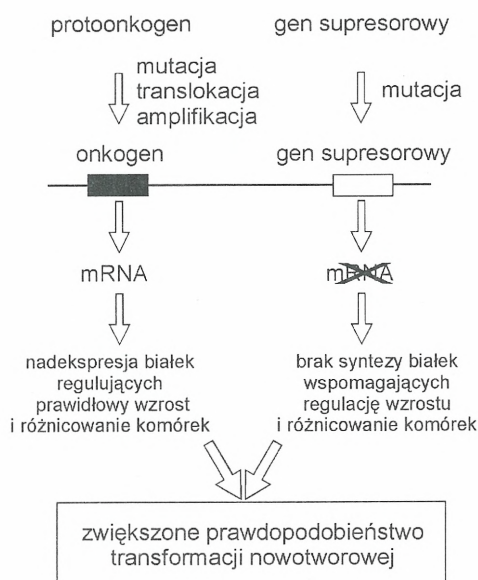
Jak już wspomniano, choroba nowotworowa jest wynikiem akumulacji mutacji w obrębie protoonkogenów i antyonkogenów. Dobrym tego przykładem jest proces prowadzący do powstawania raka jelita grubego. Według wielu badaczy rozpoczyna się on od wystąpienia mutacji w antyonkogenie *FAP* (familial adenomato-

Ryc. 4. Rola protoonkogenów i genów supresorowych w regulacji prawidłowego wzrostu i różnicowania komórek.

sus poliposis), zwanym również *APC* (adenomatous polyposis coli) zlokalizowanym w chromosomie piątym (5q). Konsekwencją tych zmian jest hiperprolifерacja komórek epitelialnych. W następnym etapie dochodzi do hipometylacji DNA a w konsekwencji do powstania gruczolaka. Dalszy rozwój gruczolaka jest wynikiem uszkodzenia zlokalizowanego w chromosomie 12 (12p) onkogenu *K-ras* oraz utraty położonego w chromosomie 18 (18q) antyonkogenu *DCC* (deleted in colon cancer). Powstanie raka jelita grubego jest wynikiem mutacji antyonkogenu *p53* położonego w chromosomie 17 (17p) (GALLICK i współaut. 1994).

Wielu autorów uważa, że jest to uniwersalny, molekularny mechanizm powstawania guzów litych. Opisane powyżej zmiany, dotyczące powstawania raka jelita grubego można wykryć izolując DNA komórek epitelialnych zawartych w 100 mg kału (z tej ilości kału można uzyskać 1–10 µg DNA). W przyszłości może to mieć kapitalne znaczenie w diagnostyce nowotworów jelita grubego (SIDRANSKY i współaut. 1992).

Jak już wspomniano, niektóre techniki biologii molekularnej znajdują zastosowanie nie



Ryc. 5. Skutki mutacji protoonkogenów i genów supresorowych.

Tabela 2. Niektóre choroby zakaźne diagnozowane za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)

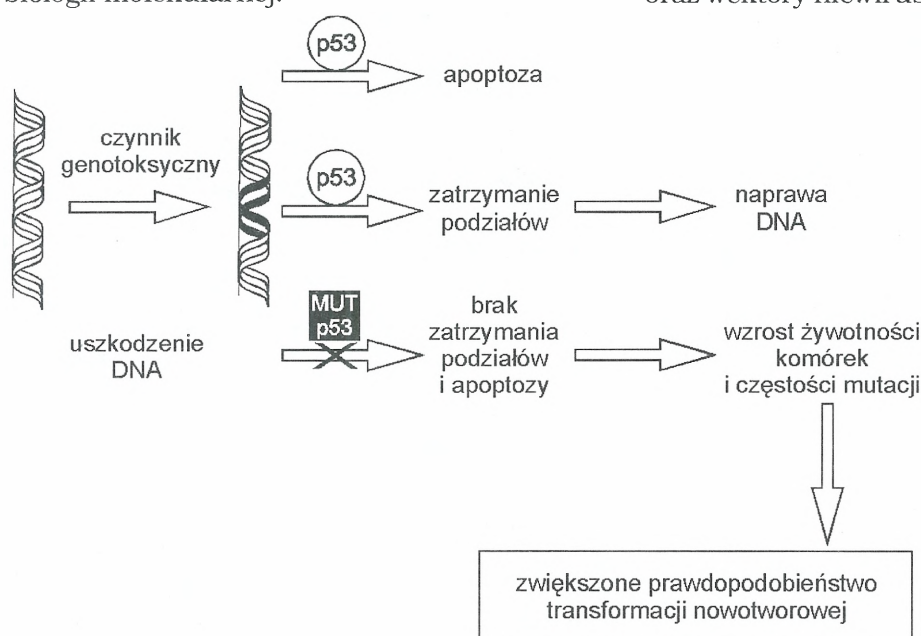
Infekcje bakteryjne	Infekcje wirusowe	Infekcje grzybicze	Infekcje powodowane przez pierwotniaki
<i>Bordetella pertussis</i>	Wirusy HBV i HCV	<i>Candida albicans</i>	<i>Entamoeba histolitica</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	Wirusy HIV 1 i 2, HTLV 1 i 2	<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Diardia lamblia</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Papilloma viruses	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Toxoplasmosa gondi</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Herpesvirus complex		<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>			<i>Penumocystis carinii</i>
<i>Neiseria gonorrhoeae</i>			
<i>Treponema pallidum</i>			
<i>Haemophilus influenzae</i>			
<i>Neisseria meningitidis</i>			
<i>Helicobacter pylori</i>			
<i>Salmonella typhi</i>			
<i>Shigella dysenteriae</i>			
<i>Borelia burgdorferi</i>			
<i>Mycobacterium leprae</i>			
<i>Enterotoxigenic E. coli</i>			

Należy również pamiętać, że już od dawna wykorzystuje się metody biologii molekularnej do produkcji różnego rodzaju leków i szczepionek. Przykładem może być rekombinacyjna insulina, hormon wzrostu, erytropoetyna oraz szczepionka przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B.

Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem terapii genowej w leczeniu chorób dziedzicznych, zakażeń wirusem HIV i

tylko w diagnostyce ale również w leczeniu chorób dziedzicznych, zakaźnych (głównie zakażenia wirusem HIV) oraz chorób nowotworowych. Wydaje się, że w najbliższym czasie badania wielu ośrodków naukowych na świecie będą koncentrowały się głównie na chorobach nowotworowych. Jednak na obecnym etapie rozwoju biologii molekularnej nie można chorym na nowotwory złośliwe, u których tradycyjne metody leczenia (chirurgia, promienioterapia i chemioterapia) zawodzą, stwarzać nadziei na szybkie i kompletne wyleczenie za pomocą technik biologii molekularnej.

chorób nowotworowych. Podstawową zasadą terapii genowej jest wprowadzenie do określonych komórek somatycznych pacjenta genu, który ulegałby transkrypcji, a powstający RNA mógłby stać się matrycą do biosyntezy białka pełniącego funkcję terapeutyczną lub sam pełnić funkcję terapeutyczną. Wydajne i selektywne wprowadzanie genów do komórek somatycznych stanie się możliwe po opracowaniu odpowiednich systemów wektorowych. Obecnie zaleca się stosowanie dwóch typów wektorów: wektory wirusowe (retowirusy i adenowirusy) oraz wektory niewirusowe zawierające gen tera-



Ryc. 6. Działanie białka p53 na komórkę, w której doszło do uszkodzenia DNA oraz skutki mutacji genu p53 (braku białka p53) w komórce.

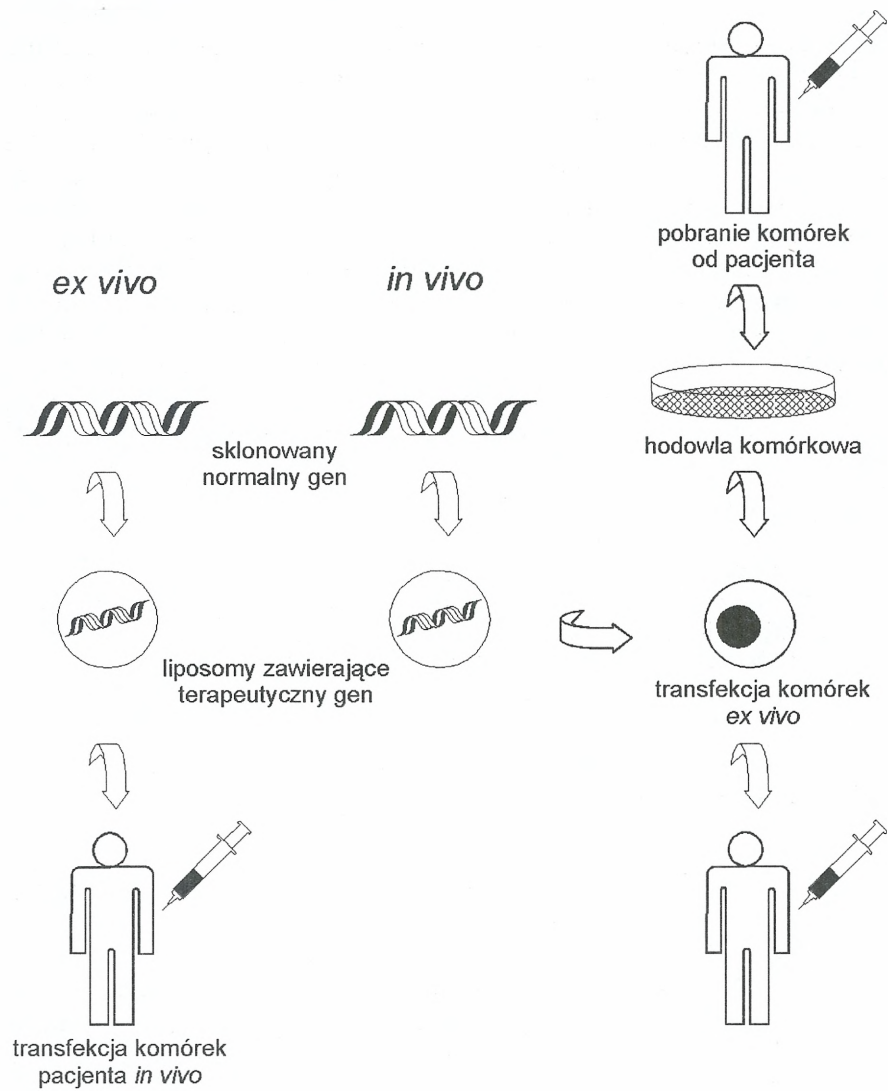
Tabela 3. Niektóre onkogeny związane z nowotworami ludzkimi i ich funkcja

Funkcja	Protoonkogen/o nkogen	Choroba nowotworowa
Czynnik wzrostu	<i>hst</i>	rak żołądka
	<i>ks3</i>	sarkoma (Kaposi)
Receptor czynnika wzrostu	<i>neu/erb-B2</i>	raki piersi, jajnika, żołądka
	<i>erb-b</i>	raki piersi
	<i>trk</i>	rak jelita grubego
Jądrowe czynniki transkrypcyjne	<i>myc</i>	chłoniaki, rak płuca
Kinazy proteinowe	<i>raf</i>	rak żołądka
	<i>met</i>	osteosarkoma
	<i>abl</i>	białaczki
Białka wiążące GTP	<i>Ha-ras</i>	rak pęcherza
	<i>Ki-ras</i>	rak jelita grubego
	<i>N-ras</i>	białaczki
Białka błonowe	<i>bcl-2</i>	chłoniaki typu B

peutyczny (liposomy i koniugaty molekularne) (MILLER i VILE 1995). Transfer genu do komórek chorego może być wykonany w warunkach *in vivo* lub *ex vivo*. Strategia *ex vivo* polega na

pobranie komórek pacjenta, założeniu hodowli pobranych komórek, wprowadzeniu (transfekcji) genu terapeutycznego za pomocą odpowiedniego wektora do hodowli komórkowej, wyselekcjonowaniu komórek zawierających gen terapeutyczny i wprowadzeniu ich do organizmu chorego. Strategia *in vivo* polega na bezpośrednim wprowadzeniu, zawartego w odpowiednim wektorze, genu terapeutycznego do organizmu chorego (WU i WU 1994). Główne strategie terapii genowej przedstawiono schematycznie na rycinie 7.

Z teoretycznego punktu widzenia najprostsze wydaje się stosowanie terapii genowej w leczeniu chorób „jednogenowych”, których przykładem są choroby dziedziczne (tab. 1). W tych przypadkach leczenie sprowadza się do zastąpienia nieprawidłowego genu (lub uzupełnienia brakującego genu) genem normalnym. Jednak doświadczenia zdobyte podczas prób leczenia ciężkiego złożonego zespołu niedoboru odporności (niedoboru deaminazy adenozy) ilustrują trudności, na które napotykają lekarze pracujący w wysoce wyspecjalizowanych



Ryc. 7. Główne strategie transferu genów terapeutycznych do komórek chorego.

Tabela 4. Przykłady genów supresorowych

Gen i jego chromosomalna lokalizacja	Właściwości produktu białkowego	Choroba nowotworowa związana z mutacją genu
<i>RBI</i> (13q)	fosfobiałko, 110 kDa, ujemny regulator cyklu komórkowego	retinoblastoma, osteosarkoma, raki płuc, piersi, pęcherza
<i>p53</i> (17p)	białko (53 kDa), wiążące specyficzne sekwencje DNA, aktywator transkrypcji	różne nowotwory
<i>DCC</i> (18q) (deleted in colon cancer)	transmembranowe białko, zbudowane z 1447 aa, reguluje różnicowanie komórek	rak jelita grubego
<i>APC</i> (FAP) (5q) (adenomatous polyposis coli, familial adenomatous polyposis)	białko zbudowane z 2843 aa	polipowatość rodzinna
<i>BRCA1</i> (17q)	białko zbudowane z 1863 aa, czynnik transkrypcyjny?	raki piersi, jajnika
<i>BRCA2</i> (13q)	?	rak piersi

ośrodkach, przy próbach wprowadzenia terapii genowej do praktyki.

Leczenie nabytego zespołu niedoboru odporności (AIDS) za pomocą terapii genowej napotyka na duże trudności ze względu na niestabilność genetyczną wirusa HIV. Proponowane obecnie strategie terapii genowej infekcji wywołanej wirusem HIV polegają między innymi na (GILBOA i SMITH 1994, DROPULIĆ i JEANG 1994):

— Hamowaniu replikacji wirusa w wyniku kompetycyjnego wiązania specyficznych (dla tego wirusa) białek zwanych Tat i Rev (stymulujących transkrypcję i transport RNA z jądra do cytosolu). Białka te są wiązane przez określone sekwencje RNA (produkowane w nadmiarze) zwane TAR i RRE.

— Stosowaniu antysensownych oligonukleotydów tworzących heterodupleksy z sekwencjami TAR i RRE.

— Produkcji wewnątrzkomórkowych przeciwwirusowych białek.

— Stosowaniu rybozymów hydrolizujących RNA wirusa HIV.

Główne strategie terapii genowej chorób nowotworowych polegają na modyfikacji genetycz-

nej prowadzącej do (FUJIWARA i współaut. 1994, CULVER i BLAESE 1994):

— zwiększenia immunogenności komórek nowotworowych (poprzez wprowadzenie do komórek nowotworowych genów kodujących obce białka);

— zwiększenia antynowotworowego działania komórek układu immunologicznego (np. wprowadzenie genu kodującego cytokiny);

— wprowadzenia genów („geny samobójcze”), których produkty (enzymy) aktywują leki (np. wprowadzenie genu kinazy tymidynowej wirusa opryszczki pospolitej — HSV-tk);

— blokowania ekspresji onkogenów (np. wprowadzenie genu kodującego antysensowny RNA dla onkogenu *K-ras*);

— zastąpienia zmutowanych genów przeciwnowotworowych (anty-onkogenów) genami prawidłowymi (np. wprowadzenie genu *p53*);

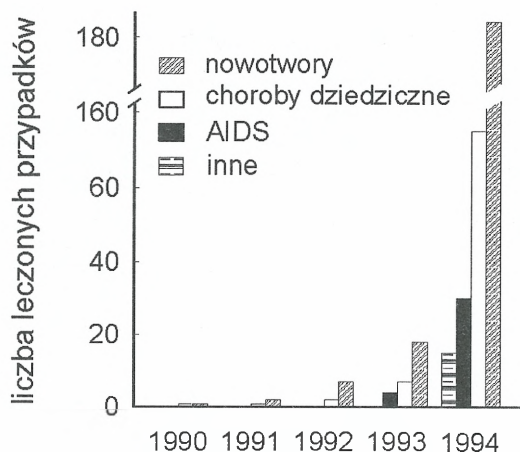
— ochrony komórek szpiku kostnego w trakcie chemioterapii poprzez wprowadzenie genu oporności wielolekowej *MDR 1* (multi drug resistance).

Strategię leczenia nowotworów polegającą na wprowadzaniu do komórek tak zwanych genów samobójczych (ang. suicide genes) omówimy nieco szerzej. W tym celu najczęściej jest stosowany gen kinazy tymidynowej wirusa opryszczki pospolitej (*HSV-tk*) (CULVER i BLAESE 1994). Gen ten koduje kinazę fosforylującą gancyklowir (nukleozydowa pochodna guaniny) do monofosforanu gancyklowiru (kinazy komórek ludzkich nie katalizują tej reakcji), który pod wpływem kinaz komórkowych jest dalej fosforylowany do dwu- i trójfosforanowej pochodnej. Ten ostatni jest związkiem silnie cytotoksycznym (w odróżnieniu od gancyklowiru) i powoduje śmierć komórek nowotworowych. Ponadto cytotoksyczne działanie nie jest ograniczone do komórki produkującej białko *HSV-TK* (kinazę tymidynową), ale obejmuje także komórki kontaktujące się z nią swą powierzchnią (ang. bystander killing effect). Teoretycznie umożliwia to całkowite zniszczenie guza nawet wtedy, gdy tylko do części komórek wprowadzony został gen *HSV-tk*. Z tego też względu proces ten określa się pojęciem „chirurgia molekularna”. Praktycznie zabieg ten dokonuje się *in vivo* wprowadzając wektor zawierający gen *HSV-tk* wprost do guza w przypadku guza pierwotnego, lub dożylnie w przypadku leczenia przerzutów nowotworowych. Po upływie kilku dni (czas konieczny do transferu genu do komórek nowotworowych i ekspresji zawartej w nim informacji genetycznej), podaje się dożylnie nietoksyczny dla komórek ludzkich gancyklowir (CULVER i BLAESE 1994).

Czy somatyczna terapia genowa jest skuteczna i bezpieczna? Wiedza na ten temat jest ciągle jeszcze niepełna. Wynika to z małej, jakkolwiek w bardzo szybkim tempie rosnącej ilości wykonanych do tej pory prób klinicznych (ryc. 8) (CULVER i BLAESE 1994). Wydaje się jednak, że terapia genowa może stać się jeszcze jedną możliwością stwarzającą choremu szansę powrotu do zdrowia. Ponadto szybki rozwój biologii molekularnej pozwala wnioskować, że wiek XXI będzie wiekiem terapii genowej.

W niniejszym opracowaniu unikaliśmy wielu szczegółów związanych z biologią molekularną. Chcieliśmy jedynie zwrócić uwagę na możliwości, jakie stwarza ta dziedzina w diagnozowaniu i leczeniu różnych chorób, nie tylko genetycznie uwarunkowanych.

Prace przeglądowe omawiające niektóre aspekty poruszane w niniejszym opracowaniu zostały również zamieszczone na łamach *Postę-*



Ryc. 8. Rozwój światowej terapii genowej w latach 1990–1994.

pów Biochemii (SŁOMSKI i KWIATKOWSKA 1995, HARŁOZIŃSKA-SZMYRKA 1995, HUMIENIECKI 1995, HUMIENIECKI 1996).

MOLECULAR BIOLOGY AND ITS APPLICATION IN MEDICINE

Summary

Major discoveries in molecular biology over the past half century have established the scientific basis for current molecular approaches to studying human disease. In this review, we discuss: a) general principles of application of molecular biology techniques in diagnosis of hereditary diseases (diseases caused by single gene defects) as well as for acquired diseases such as cancer or infectious disease;

b) molecular changes that lead to development of cancer (mutations in the proto-oncogenes and mutation and inactivation of tumor suppressor gene p53); c) two general strategies for gene therapy: *ex vivo* and *in vivo*; d) potential strategies for gene therapy in the treatment of cancer and human immunodeficiency virus (HIV) infection.

LITERATURA

- CULVER K. W., BLAESE R. M., 1994. *Gene therapy for cancer*. TIG 10, 174–178.
- DONEHOWER L. A., 1994. *Tumor Suppressor gene p53 and apoptosis*. Cancer Bull. 46, 161–166.
- DROPUŁIĆ B., JEANG K. -T 1994. *Gene therapy for human immunodeficiency virus infection: Genetic antiviral strategies and targets for intervention*. Human Gene Therapy 5, 927–939.
- EMERY A. E. H., MALCOLM S., 1995. *An Introduction to Recombinant DNA in Medicine, Second Edition* (John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore).
- FUJIWARA T., GRIMM E., ROTH J. A., 1994. *Gene therapeutics and gene therapy for cancer*. Current Opinion in Oncology 6, 96–105.
- GALLICK G. E., GARCIA R. A., STALEY C. A., MOSKAL T. L., HUANG S., CHAKRABARTY S., 1994. *Molecular alterations during colon tumorigenesis: An overview of growth regulatory pathways and potential therapeutic implication*. Cancer Bull. 46, 296–302.
- GILBOA E., SMITH C., 1994. *Gene therapy for infectious diseases: The AIDS model*. TIG 10, 139–144.
- HARGRST R., WILLIAMSON R., 1996. *Prophylactic gene therapy for cancer*. Gene Therapy 3, 97–102.
- HARŁOZIŃSKA-SZMYRKA A., 1995. *Nowotwory jako choroba genów*. Postępy Biochemii 41, 7–15.
- HUMIENIECKI Ł., 1995. *Terapia genowa — wektory i strategie*. Postępy Biochemii 41, 230–236.
- HUMIENIECKI Ł., 1996. *Somatyczna terapia genowa — czy jest bezpieczna?* Postępy Biochemii 42, 14–21.
- KRONTIRIS T. G., 1995. *Oncogenes*. New England J. Med. 333, 303–306.
- MASTRANGELO M. J., BERD D., NATHAN F. E., LATTIME E. C., 1996. *Gene therapy for human cancer: An assay for clinicians*. Seminars in Oncology 23, 4–21.
- MEAGER A., GRIFFITHS E., 1994. *Human somatic gene therapy*. TIB TECH. 12, 108–113.
- MILLER A. D., 1990. *Progress toward human gene therapy*. Blood 76, 271–278.
- MILLER N., VILE R., 1995. *Targeted vectors for gene therapy*. FASEB J. 9, 1990–199.
- NABEL E. G., POMPILI V. J., PLAUTZ G. E., NABEL G. J., 1994. *Gene transfer and vascular disease*. Cardiovascular Res. 28, 445–455.
- SIDRANSKY D., TOKINO T., HAMILTON S. R. et al., 1992. *Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors*. Science 256, 102–105.
- SŁOMSKI R., KWIATKOWSKA J., 1995. *Diagnostyka molekularna: amplifikacja sekwencji czy wzmacnianie sygnału?* Postępy Biochemii 41, 220–229.
- WU G. Y., WU C. H., 1994. *Gene therapy by targeting nucleic acids to hepatocytes. The liver: Biology and Pathobiology*, I. M. ARIAS, J. L. BOYER, N. FAUSTO, W. B. JAKOBY, D. A. SCHACHTER, D. A. SHAFRITZ (red.), Third Edition.