

EWELINA ZIEMIŃSKA, RAFAŁ PŁATEK, MAŁGORZATA SKUP

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

E-mail: e.ziemińska@nencki.gov.pl

rplatek@nencki.gov.pl

m.skup@nencki.gov.pl

OBŁASKAWIONE WIRUSY W SŁUŻBIE NAUKI I MEDYCYNY

WPROWADZENIE

Współczesna medycyna notuje w swoim dorobku wiele spektakularnych osiągnięć i rozwiązań, zarówno w dziedzinie diagnostyki, jak też w leczeniu chorób, mając do dyspozycji potężne leki i narzędzia chirurgiczne. Opanowano metody przeszczepów; transplantologia przedłuża życie pacjentów i poprawia jakość życia. Jednak w dziedzinie psychiatrii i neurologii, w próbach leczenia chorób zwyrodnieniowych układu nerwowego, takich jak choroba Alzheimera i Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne (ALS), czy w próbach przywracania funkcji utraconych wskutek urazów, często jesteśmy bezradni. Musimy się zmierzyć ze złożoną budową mózgu i rdzenia kręgowego, które próbujemy odbudowywać lub pobudzać do działania. Na

przeszkodzie stoi brak narzędzi, które kierowałyby lek tylko do zmienionych miejsc w mózgu oraz niedostępność tych miejsc dla wielu leków. Dlaczego? Otóż układ nerwowy jest najbardziej chronionym spośród wszystkich układów organizmu przed przedostaniem się obcych, działających szkodliwie cząsteczek. Pomiedzy mózgiem i rdzeniem kręgowym a resztą ciała znajduje się bariera (tzw. bariera krew-mózg, ang. blood brain barrier, BBB), która jest nieprzepuszczalna dla wielu substancji docierających z obwodu. Mózg broni się w ten sposób przed czynnikami infekcyjnymi i wpływem substancji szkodliwych. Aby tę barierę pokonać i dotrzeć do uszkodzonych tkanek, sięgamy po różne metody.

JAK DOTRZEĆ Z TERAPIĄ?

Szukając możliwości pobudzania regeneracji i odtwarzania utraconych połączeń nerwowych by przywrócić ich funkcję, sięgnięto m.in. po czynniki troficzne. Są to małe białka, wytwarzane przez neurony, które pobudzają ich aktywność i regenerację. Występują obficie w mózgu zdrowym, ale po urazie zaczyna ich brakować. Aby uzupełnić niedobory, próbujemy więc je dostarczać. Ale białka nie przedostają się przez prawidłowo funkcjonującą barierę krew-mózg. Nawet wszczepione do mięszu mózgu czy rdzenia, bywają nieskuteczne, bo ulegają rozkładowi lub, tak jak czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (ang. Brain

Derived Neurotrophic Factor, BDNF), są zatrzymywane przez pewne receptory błonowe, rozsiane w mięszu mózgu i rdzenia kręgowego. Ci strażnicy tkankowi sprawiają, że BDNF rozprzestrzenia się z trudem. Naukowcy wpadli więc na pomysł, by już wewnątrz uszkodzonych tkanek zbudować mikroskopijne „fabryczki” tych substancji. Najlepiej byłoby, aby produkcję tych białek podjęły same komórki nerwowe, wtedy mogłaby się ona odbywać w rytm zapotrzebowania na te białka, sygnalizowany komórce przez jej otoczenie. Żeby to było możliwe, należało do tych komórek dostarczyć geny kodujące białka BDNF.

Izolowanie, klonowanie i sekwencjonowanie genów, wsparte wielkoformatowymi analizami ich zależności i regulacji, umożliwiły rozwój tzw. terapii genowej, polegającej na naprawie lub zastąpieniu wadliwie funkcjonującego genu. W szczególności, strategie naprawcze, stosowane po uszkodzeniach układu nerwowego, polegają na dostarczeniu egzogenego, matrycowego DNA, w celu lokalnego wzmocnienia lub wyhamowania ekspresji tych białek strukturalnych lub regulatorowych, które pełnią istotną rolę w odbudowie sieci neuronowych i przywracaniu funkcji. Trudnością w rozwoju tej terapii jest znalezienie nośnika (wektora), który wprowadzałby skutecznie geny do komórek docelowych, nie powodując zarazem skutków ubocznych. I tu na scenę wkraczają wirusy.

Wirusy są małymi cząstkami materii, złożonymi z białek i kwasów nukleinowych. Nie są organizmami, bo nie mają budowy komórkowej i nie mogą samodzielnie rozmnażać się. Do namnażania potrzebują gospodarza – komórki, do której wnikną i którą zmuszą do pracy na swoją korzyść. Są więc pasożytami, często groźnymi dla życia człowieka. Skąd więc pomysł, by je zaprząć do pracy, licząc na ich dobroczynne działanie?

Otóż wirusy opanowały umiejętność wnikania do komórek, mogą więc być skutecznym nośnikiem genu, który chcemy dostarczyć neuronom. Ale jak obłaskawić wirusy, pozbawić je własności chorobotwórczych, nie niszcząc ich zdolności do kontroli produkcji białka?

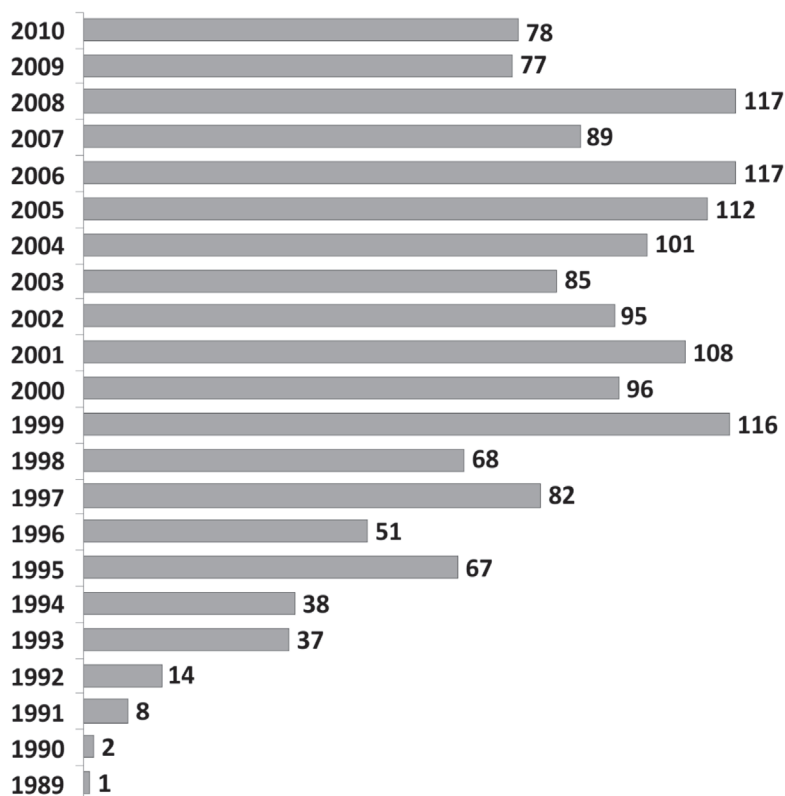
ZAPRZĄC WIRUSY DO SŁUŻBY W MEDYCYNIE: JAK JE OBLASKAWIĆ ?

W większości obecnie testowanych klinicznie protokołów terapii genowej chorób

neurologicznych nośnikami genów są pochodne wirusów (Tabela 1 i 4), które roz-

Tabela 1. Porównanie liczby badań klinicznych z użyciem terapii genowych, rozpoczętych w kolejnych latach w okresie od 1989 do 2010 roku. Dane dotyczą krajów całego świata.

Badania kliniczne, podjęte w tym okresie ze wskazań neurologicznych, stanowiły 1,8% wszystkich prób (30 badań), a terapie chorób oczu 1,2% wszystkich prób (20 badań). Połowę wszystkich badań stanowią próby prowadzone z użyciem adenowirusów (23,7%), retrowirusów (20,5%) i parwowirusów stowarzyszonych z adenowirusami (dependowirusy, AAV; 4,7%). Wg www.wiley.com (Journal of Gene Medicine, Wiley and Sons), zmodyfikowane.



winęły wydajny system przenoszenia swoich genów do komórek ssących. Konstrukcja cząsteczki wektora wirusowego polega na zastąpieniu endogennych genów wirusowych, których produkty białkowe mogą być chorobotwórcze, genem lub genami „leczniczymi”, zaopatrzonymi w odpowiednie sekwencje promotorowe i regulatorowe. W niektórych przypadkach rekombinowaną cząsteczkę DNA opłaszczą się białkami kapsydu wirusowego, co umożliwia jej przeniknięcie i ekspresję transgenu w odpowiednich komórkach człowieka. Tak przygotowane wektory wirusowe mogą być wykorzystane do wprowadzania genów do komórek mózgu i rdzenia kręgowego, a więc do powodowania ekspresji transgenów, czyli genów przeniesionych w celu wywołania efektu terapeutycznego. Wprowadzany gen może być dodatkową matrycą do produkcji białka, którego deficyt jest w ten sposób uzupełniany lub matrycą do produkcji białek obcych, które wzbogacają repertuar białek, wytwarzanych przez daną komórkę.

Jednym z tego rodzaju nośników jest wektor stanowiący pochodną dependowirusów, czyli wirusów zależnych od adenowirusów, inaczej AAV (ang. Adeno-Associated

Virus). Należą one do rodziny Parvoviridae. AAV zajmują piątą pozycję na liście najczęściej stosowanych nośników genów pochodzenia wirusowego w testowanych obecnie terapiach genowych chorób człowieka (4,7% badań klinicznych z użyciem terapii genowych (Tabela 1).

Historia transferu genów z użyciem AAV nie jest długa, z uwagi na do niedawna niewielkie zainteresowanie badaczy grupą Parvoviridae. Ta mała rodzina jednych z najmniejszych (łac. *parvus*, mały) wirusów, których materiał genetyczny stanowi jednociowy kwas deoksyrybonukleinowy (ang. single-stranded DNA, ssDNA), nie stanowiąc patogennego zagrożenia dla człowieka, była przedmiotem zainteresowania tylko niewielkiej grupy wirusologów, zafascynowanych ich niezwykłą biologią. Ich cykl replikacyjny zależy od wirusa wspomagającego, którym jest adenowirus (Ad) lub wirus herpes (HPV). Pionierską próbę transgenizacji komórek ssących *in vitro* z użyciem AAV podjęli HERMONAT i MUZYCZKA (1984), jednak kolejne prace datowane są dopiero na rok 1990, stanowiący początek dynamicznego rozwoju tej technologii, który trwa do dziś.

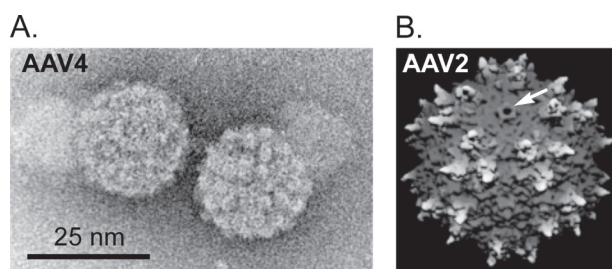
BIOLOGIA WIRUSÓW AAV

Wiriony AAV są małe (średnica: 18-26 nm) i nie posiadają osłonki wirusowej. Ich dwudziestościenny (ikosaedralny) kapsyd (Ryc. 1), o trójosiowej symetrii, składa się z 60 podjednostek, należących do trzech rodzajów białek strukturalnych (kapsomerów): VP1, VP2 i VP3, które tworzą go w stosunku, odpowiednio, 1:1:10. Te trzy białka płaszczą kodowane są przez wzajemnie nakładające się sekwencje, dlatego ich skład aminokwasowy jest zbliżony (różnice dotyczą N-końca peptydów). Mają one charakter kwasowy, nie są glikozylowane oraz trudno rozpuszczają się w wodzie. Ze względów praktycznych jest istotne, że są one odporne na działanie proteaz, detergentów oraz rozpuszczalników organicznych. Również naprzemienne rozmrażanie/zamrażanie, liofilizacja, ogrzewanie do 56°C czy zmiany pH (w zakresie 3-9) nie obniżają infekcyjności cząsteczek AAV.

Każdy wirion zawiera pojedynczą kopię jednociowego DNA (ssDNA) wirusa, złożoną z 4675 zasad. Ponieważ ssDNA jest nieaktywne transkrypcyjnie, przekształcenie geno-

mu wirusowego w dwuniciowe, matrycowe DNA, jest etapem limitującym wydajność ekspresji, zarówno w przypadku wirusowego jak i wektorowego materiału genetycznego (FERRARI i współaut. 1996).

Genomowa sekwencja nukleotydowa zawiera dwie duże otwarte ramki odczytu (ang. open reading frames, ORF), kodujące geny *Rep* (białka zaangażowane w replikację i regulację ekspresji) i *Cap* (białka strukturalne), oflankowane na 3' i 5' końcach palindromicznymi sekwencjami o odwróconej polarności (ang. Inverted Terminal Repeats, ITR) (Ryc. 2A) (SAMULSKI i współaut. 1983). W 2010 r. udokumentowano istnienie w genomie AAV2 ORF białka AAP (ang. Assembly-Activating Protein), zlokalizowanej we wnętrzu ORF genów *Cap*. W 2011 r. potwierdzono jej istnienie również dla pozostałych serotypów AAV (SONNTAG i współaut. 2010, 2011). AAP może (1) umożliwiać transport białek VP do jądra, (2) stanowić rusztowanie umożliwiające zestawienie kapsomerów w formę kapsydu albo (3) pełnić rolę białka opiekuńczego w procesie fałdowania białek



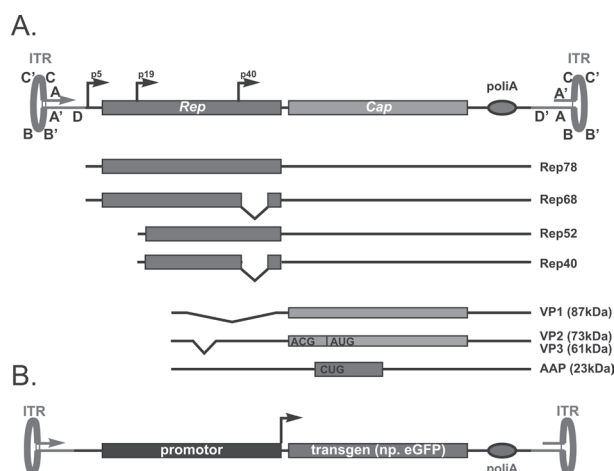
Rycina 1. Struktura kapsydu wirusów AAV.

A. Mikrografia elektronowa wirionów AAV4 (wg PADRON i współaut. 2005). Obraz **B** przedstawia powierzchnię kapsydu wektora AAV2 (wg XIE i współaut. 2002). Strzałka wskazuje wąski kanał o pięciopięciokątnej symetrii, który może służyć do prezentacji domeny fosfolipazowej A₂, znajdującej się na N-końcu białka strukturalnego VP1. Domena ta umożliwia uwolnienie się wirusa z późnego endosomu i jego dalszą wędrówkę w kierunku jądra komórkowego.

VP. ITR stanowią 145. nukleotydowe odcinki DNA, których fragmenty o długości 125 par zasad, bogate w pary GC, tworzą struktury szpilki do włosów o kształcie litery T (ACC'BB'A'), a pozostały odcinek D, o długości 20 nukleotydów, jest niesparowany (Ryc. 2A). Pomimo znaczących różnic w palindromowej sekwencji DNA, różnicującej poszczególne serotypy wirusa, pozostaje ona zawsze zdolna do tworzenia T-kształtnej struktury drugorzędowej.

Odcinki ITR, działając *in cis*, pełnią niezbędne funkcje na poszczególnych etapach cyklu litycznego: replikacji, inicjacji transkrypcji i formowaniu nukleokapsydu. Są one konieczne do specyficznej integracji AAV z genomem gospodarza, ale również negatywnie regulują ekspresję genów wirusa w środowisku niesprzyjającym replikacji (BERNS 1990). Z punktu widzenia zastosowania tych wirusów do konstruowania wektorów AAV, sekwencje ITR, zlokalizowane *in cis*, okazały się być jedynymi fragmentami endogennej sekwencji wirusowej, które są niezbędne do wytworzenia aktywnie infekujących cząsteczek wektorów.

Ze względu na wyjątkowo mały rozmiar genomu AAV, produkty białkowe obu ORF pełnią kilka funkcji. Gen *Rep* koduje co najmniej cztery białka (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40; Ryc. 2). Podobnie jak w białkach strukturalnych, ich sekwencje nakładają się. Białka Rep, oprócz kontroli replikacji, regulują również ekspresję genów wirusowych: (1) pod nieobecność wirusa pomocniczego hamują ekspresję genów AAV i replikację



Rycina 2. Struktura genomu wirusów AAV oraz produktów ich genów (A) oraz struktura genomów rekombinowanych wektorów wirusowych AAV (B).

A. Genom niezmodyfikowanego, „dzikiego” wirusa AAV składa się z dwóch palindromowych sekwencji ITR, flankujących dwie otwarte ramki odczytu (ORF; ang. Open Reading Frame) dla genów *Rep* (kodującego białka regulujące replikację i ekspresję genów wirusa) i *Cap* (kodującego białka kapsydu wirusa). W obrębie genu *Cap* znajduje się ORF dla białka AAP (ang. Assembly-Activating Protein), charakteryzująca się nietypowym kodonem startu translacji (CUG). AAP reguluje proces składania kapsydu AAV z białek strukturalnych, do którego dochodzi na terenie jądra komórki gospodarza. Na rycinie B przedstawiono schemat genomu wektora AAV (zawierający transgen i sekwencje regulatorowe), oflankowany sekwencjami ITR, które są jedynymi pozostawionymi fragmentami wirusowego DNA. Rycina wg *Gene and Expression in Mammalian Cells*, New Comprehensive Biochemistry, vol. 38, Elsevier 2003, zmodyfikowano.

DNA; (2) biorą udział w procesie integracji/ligacji wirusowego genomu do genomu gospodarza i wytworzenia stanu utajenia; (3) w obecności wirusa pomocniczego są transaktywatorem ekspresji genów wirusowych; (4) biorą udział w uwolnieniu wirusowego genomu z DNA komórkowego.

Ekspresja genów dzikich wirusów AAV koordynowana jest przez trzy promotory; gen *Rep* znajduje się pod kontrolą promotorów p5 i p19 a ekspresja strukturalnego genu *Cap* jest kontrolowana przez promotor p40, zlokalizowany w sekwencji genu *Rep* (Ryc. 2A). Do replikacji i inicjacji cyklu litycznego wirusa dochodzi na terenie

jądra komórkowego, gdy komórka znajduje się w fazie syntezy (faza S); replikacja zależy od obecności produktów pięciu genów wirusa wspomagającego (Ad): *E1A*, *E1B*, *E4*, *E2A* oraz VA RNA (BERNS 1990).

Wektory AAV są pozbawione endogennych genów *Rep* i *Cap* (Ryc. 2B), nie mają

więc możliwości powielania materiału genetycznego oraz specyficznej integracji z genomem gospodarza, nawet przy nieplanowanej, współtowarzyszącej infekcji Ad lub HSV.

Ten fakt ma zasadnicze znaczenie dla planowania bezpiecznych terapii eksperymentalnych i klinicznych.

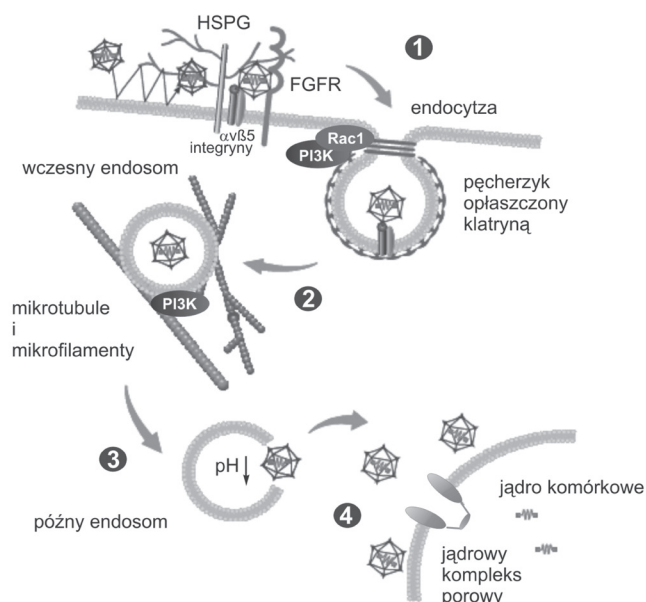
INFEKOWANIE KOMÓRKI PRZEZ AAV

Infekcja wirusowa to wieloetapowy proces, wymagający od cząsteczki wirusa pokonania barier na drodze do jądra komórkowego (Ryc. 3). Infekcja odbywa się stopnio-

wo: (1) związanie z I-rzędowym receptorem powierzchniowym, (2) wejście do komórki gospodarza, (3) transport wewnątrzkomórkowy, (4) uwolnienie się z późnego endosomu, (5) dekapcydacja, (6) wejście DNA na teren jądra. Następnie dochodzi do konwersji genomu wirusa z jednociowego do dwuniciowego i jego integracji z genomem gospodarza lub utrzymywania się wirusa w formie episomalnej, zdolnej do ekspresji kodowanego genu. Przebieg infekcji najlepiej scharakteryzowano w przypadku dzikiego wirusa o serotypie AAV2, który odkryto i opisano jako jeden z pierwszych (BÜNING i współaut. 2008).

Używając technologii pozwalającej na śledzenie losu pojedynczej cząsteczki wirionu na drodze do jądra komórkowego wykazano, że wiriony AAV2 mogą kilkakrotnie, bezowocnie stykać się z powierzchnią błony komórkowej, nim skutecznie zwiążą się z receptorami komórkowymi.

Receptorami I-go rzędu, wiążącymi AAV2 z powierzchnią komórki, są zakotwiczone w błonie komórkowej wielkocząsteczkowe składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, złożone z rdzenia białkowego, połączonego kowalencyjnie z glikozoaminoglikanem (tu: proteoglikanem heparanosiarczanowym; ang. Heparan Sulfate Proteoglycan, HSPG).



Rycina 3. Schemat przebiegu infekcji komórki przez wirusy AAV2.

AAV2 wiąże się z zakotwiczonym w błonie komórkowej proteoglikanem heparanosiarczanowym (HSPG, ang. Heparan Sulfate Proteoglycan). Wiązanie to wzmacniają ko-receptory: receptor czynnika wzrostu fibroblastów 1 (FGFR-1) i/lub receptor czynnika wzrostu hepatocytów (HGFR). Następnie związanie z integrzynami prowadzi do endocytozy wirionów z udziałem pęcherzyków opłaszczonych klatryną (1). Aktywacja ścieżki białka Rac1 i kinazy 3-fosfatydoinozytolu (PI3K) skutkuje rearanżacją cytoszkieletu, pośredniczącego w aktywnym transporcie endosomów do przestrzeni okołojądrowej. Transport AAV2 odbywa się po mikrotubulach, z udziałem dyneiny (KELKAR i współaut. 2006) (2). Odczyn kwasowy wnętrza endosomu prowadzi do zmiany konformacyjnej w białkach kapsydu i uwolnienia wirionów. W procesie tym bierze udział fosfolipazowa domena A₂, znajdująca się na N-końcu białka VP1 (3). Choć wirion AAV jest wystarczająco mały by jego penetracja do jądra odbyła się poprzez jądrowe kompleksy porowe (max. Ø 25 nm) (4), do dziś nie rozstrzygnięto czy do jądra wnika cały wirion (SONNTAG i współaut. 2006), czy też naga cząsteczka DNA (MANI i współaut. 2006). Na terenie jądra wirusowe DNA ulega replikacji (cykl lityczny) lub integruje się z DNA chromosomu 19 (cykl latentny). Rycina wg BÜNING i współaut. 2008, zmodyfikowano.

Tabela 2. Komórkowe receptory i białka powierzchniowe, wykorzystywane przez poszczególne serotypy wirusów AAV do wniknięcia do komórki gospodarza (wg BÜNING i współaut. 2008).

Serotyp AAV	Receptor I-go rzędu	Ko-receptor(y) i białka wiążące
AAV1	nieopisany	nieopisany
AAV2	HSPG	FGFR-1 HGFR Receptor lamininy Integryna $\alpha_5\beta_1$ Integryna $\alpha_5\beta_1$ FGFR-1 Receptor lamininy
AAV3	HSPG	
AAV4	O-podstawiony kwas sjałowy	
AAV5	N-podstawiony kwas sjałowy	PDGFR- α
AAV6	kwas sjałowy	
AAV7	HSPG	
AAV8	nieopisany	nieopisany
AAV9		Receptor lamininy
AAV10, AAV11, AAV12, AAVmo-1, AAVra-1	nieopisane	Receptor lamininy nieopisane

HSPG ma dwie twarze, ponieważ jego nadmiar w macierzy zewnątrzkomórkowej może prowadzić do wychwytywania wirionów, blokując

działanie przez pozostałe serotypy wirusa, przedstawiono w Tabeli 2.

KONSTRUOWANIE NOŚNIKA GENÓW AAV

Wektory AAV powstają poprzez wstawienie transgenu, czyli sekwencji kodującej białko, np. terapeutyczne, w miejsce sekwencji *Rep* i *Cap* (Ryc. 2). Aby powstały w pełni funkcjonalne cząstki AAV, fragmenty ITR na końcach 5' i 3' wirusowej sekwencji kodującej transgen, muszą być obecne *in cis*. Produkcję AAV prowadzono pierwotnie w obecności wirusów pomocniczych. Preparaty takie były jednak zanieczyszczone elementami pochodnymi tych wirusów i charakteryzowały się dużą immunogennością. Współcześnie, metoda produkcji AAV wykorzystuje trój- lub dwuplazmidową ko-transfekcję komórek embrionalnych nerki człowieka (ang. Human Embryonic Kidney Cells, HEK) linii 293 (tzw. linia pakująca). Komórki te zawierają region *E1A* i *E1B* genomu adenowirusowego (Ad5) (GRAHAM i współaut. 1977). Region ten koduje *in trans* białko E1 adenowirusa. Pozostałe geny niezbędne do powstania wirionów AAV dostarczane są w plazmidzie zawierającym transgen (wektor 1) oraz dwóch plazmidach pomocniczych. Jeden z nich zawiera genom wirusowy AAV – geny *Rep* i *Cap* (AAV-helper plazmid, wektor 2), a w kolejnym zakodowane są białka adenowirusowe

dalsze etapy inwazji wirusa. Wiązanie z HSPG powoduje zmiany konformacyjne w kapsydzie AAV, niezbędne do jego dalszego oddziaływania z ko-receptorami, które wzmacniają wiązanie AAV (FGFR) i warunkują jego endocytozę (z udziałem integrzyn). Również przebieg transportu pęcherzyków endosomalnych do przestrzeni okołojądrowej może ograniczać wydajność transdukcji AAV (Ryc. 3). Są przesłanki, że rozpad kapsydu wirionu i uwolnienie genomowego DNA przebiega na drodze ubikwitylacji i degradacji proteosomalnej (LUX i współaut. 2005). Dotychczas poznane komórkowe receptory powierzchniowe, wykorzystywane przez pozostałe serotypy wirusa, przedstawiono w Tabeli 2.

E2A, E4ORF6, oraz niekodujące RNA – VA RNA (Ad-helper plazmid, wektor 3) (XIAO i współaut. 1998). System transfekcji trójplazmidowej jest dostępny komercyjnie od kilku lat. W przypadku infekcji dwuplazmidowej jeden plazmid koduje transgen (wektor 1), natomiast geny *Rep*, *Cap* oraz geny adenowirusowe dostarczane są do komórek *in trans* na jednym wspólnym plazmidzie pomocniczym (pDG) (GRIMM i współaut. 1998, JAŻWA i współaut. 2007). Uzyskane obiema technikami wektory są defektywne replikacyjnie.

Izolowanie cząsteczek wektorów z komórek HEK293 rozpoczyna się od wirowania lizatów komórkowych w gradiencie jodksanolu. Uwolnione cząsteczki wektora osadza się na kolumnach wypełnionych złożem heparynowym, poddaje elucji oraz zbiera ich frakcje z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, ang. high performance liquid chromatography) (ZOŁOTUKHIN i współaut. 1999). Procedura ta, w której wykorzystuje się zdolność wiązania cząsteczek AAV serotypu 2 z siarczanem heparanu, pozwala na uzyskiwanie wysokiej czystości izolatów.

WŁAŚCIWOŚCI KAPSYDU AAV

Poznanie właściwości kapsydów AAV umożliwiających im wiązanie się z recepto-rami i białkami powierzchniowymi komórek docelowych (Tabela 2), pozwoliło na selekcję i dobór serotypów wektorów, które najwydajniej transdukują dany rodzaj tkanki czy organ.

AAV2 skutecznie transdukuje różne tkanki, ale AAV1 cechuje większa skuteczność transdukcji mięśni, stawów, komórek trzustki, serca i wątroby, śródbłonna naczyń krwionośnych oraz komórek ośrodkowego układu nerwowego. Połączenie sekwencji ITR AAV2 z białkami kapsydowymi obu serotypów doprowadziło do powstania tzw. wektora mozaikowego AAV2/1. To pozwoliło na znaczące zwiększenie wydajności transdukcji przy zachowaniu specyficznego

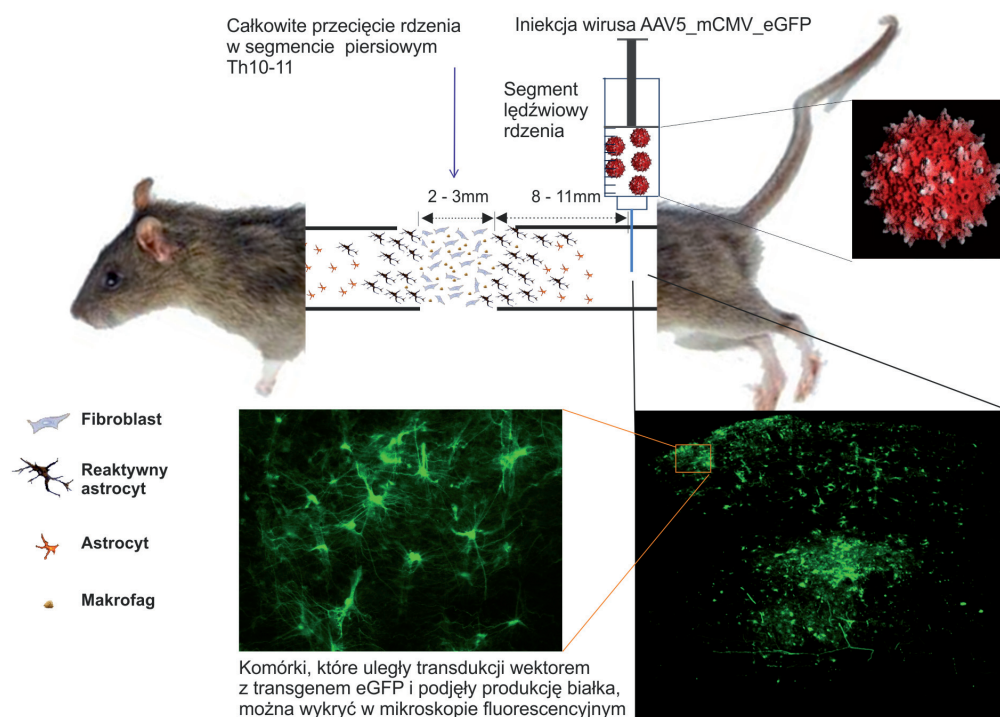
dla AAV1 tropizmu komórkowego. Podobnie AAV4 wykazuje zwiększone, w stosunku do dzikiego serotypu, powinowactwo do komórek mózgu i siatkówki, AAV5 – komórek mózgu, rdzenia kręgowego, płuc, stawów i komórek wątroby, AAV6 – mięśni szkieletowych, komórek serca oraz śródbłonna dróg oddechowych, AAV7 – mięśni, a AAV8 do mięśni, komórek trzustki, serca i wątroby. Jakkolwiek większość prac dokumentująca tropizm poszczególnych serotypów wektorów (WU i współaut. 2006), różni się zastosowanym modelem, ilością i sposobem podania wektora czy też metodologią analizy wydajności transdukcji, to uzyskujemy dowód, że wektor o danym serotypie ma zdolność do infekcji różnych tkanek i komórek.

LOS WSZCZEPIANEGO WEKTORA I REKOMBINOWANEGO BIAŁKA MOŻNA ŚLEDZIĆ W TKANCE

Niezwykłą karierę w biologii, wszędzie tam, gdzie chcemy zobaczyć to, co niewidzialne, robi białko zielonej fluorescencji, którego anglojęzyczna nazwa brzmi Green Fluorescent Protein (GFP). Jest to białko, które występuje w wielu organizmach niższych, z których najbardziej znanym jest meduza *Aequorea victoria*. Białko tej meduzy, po skierowaniu nań wiązki światła, emituje silne, zielone promieniowanie. Jego gen można wprowadzić do komórek, sprzęgając go z rejonem regulatorowym genu „naszego”, niewidzialnego białka. Świecenie tego białka, czy jego udoskonalonej formy, eGFP (ang. enhanced Green Fluorescent Protein), która świeci silniej niż „zwykłe” GFP, wskazuje miejsca, w których występuje nasze białko. Dlatego gen eGFP nazywany jest genem reporterowym. Jeśli wprowadzimy do mięszu mózgu lub rdzenia kręgowego wektor AAV, który będzie zawierał gen eGFP, będziemy mogli śledzić los wektora, obserwując miejsca, w których pojawiają się komórki, świecące na zielono. Takie podejście wykorzystuje się, próbując odpowiedzieć na pytanie, który z serotypów AAV najskuteczniej transdukuje wybrane struktury mózgowe czy rdzeniowe. Za

przykład sposobu identyfikacji miejsc, w których znajduje się wszczepiany transgen, posłuży materiał z badań własnych (Ryc. 4).

Zajmujemy się próbami terapii eksperymentalnych uszkodzeń rdzenia kręgowego. W jednym z modeli doświadczalnych przecinamy szczyrom rdzeń kręgowy i dokonujemy iniekcji wektorów AAV z różnymi transgenami – wspomnianym wcześniej BDNF i/lub białkiem adhezji komórkowej L1, ważnymi w procesie rozwoju układu nerwowego, ale również o potencjalnym działaniu terapeutycznym w procesach pouszkodzeniowych. W obu przypadkach próbujemy pobudzić procesy plastyczności neuronalnej, to znaczy zastymulować wzrost wypustek nerwowych i reorganizację ich połączeń. Żeby jednak ocenić, czy nasze wektory wirusowe pracują i gdzie należy się spodziewać syntezy naszych białek, trzeba je móc zobaczyć i do tego celu wykorzystujemy wektor z transgenem eGFP. Na rycinie 4 możemy zobaczyć przykładowe zdjęcia transdukowanych komórek rdzenia kręgowego w podłużnych skrawkach rdzenia, po 5 tygodniach od podania wirusa.



Rycina 4. Model doświadczalny uszkodzenia rdzenia kręgowego oraz iniekcji wektora wirusowego.

Wszczepiony wektor wirusowy rozprzestrzeni się w mięszu rdzenia kręgowego i zaopatruje w transgen sieć komórek rdzenia poniżej miejsca uszkodzenia. Obrazy z mikroskopii fluorescencyjnej (spód schematu) pokazują zakres transdukowanych komórek w osi grzbietowo-brzuszej (zdjęcie prawe) oraz w powiększeniu, transdukowane astrocyty w części grzbietowej istoty białej rdzenia kręgowego z segmentu lędźwiowego (materiał własny, R. Płatek).

MODYFIKACJE KAPSYDU WEKTORA

W celu zwiększenia użyteczności wektorów AAV, próbuje się modyfikować ich tropizm do wybranych populacji komórkowych. Najprostsze przekształcenie polega na zapakowaniu transgeny o flankowanego sekwencjami ITR serotypu 2 do kapsydu o innym niż AAV2 serotypie (ang. pseudopackaged AAV vectors). Natomiast wektory mozaikowe cechuje mieszany skład kapsomerów, pochodzących z dwóch różnych serotypów wektora. Specyficzność AAV można również zwiększyć poprzez opłaszczenie kapsydu wyjściowego ligandami, zwiększającymi jego zdolność do wiązania się z wybranymi receptorami komórkowymi. Wprowadzona zmiana może wiązać się z modyfikacją genetyczną, która prowadzi do przyłączenia sekwencji białka, np. domeny rozpoznającej antygen powierzchniowy, do łańcucha białek strukturalnych kapsydu (VP) (chimery AAV).

Może też polegać na fizycznym opłaszczeniu powierzchni kapsydu (ang. re-targeted AAV). Zastosowanie obu wariantów znosi pierwotny serotyp wektora.

BURGER i współaut. (2004) wykazali, że mozaikowe serotypy AAV2/1 i AAV2/5 transdukują komórki rdzenia kręgowego wydajniej niż dziki AAV2 oraz, że preferencyjnie transdukują neurony. Znaczący wzrost wydajności dotyczył zarówno liczby transdukowanych komórek jak i poziomu ekspresji transgeny markerowego, eGFP. Wyższy, w porównaniu z dzikim AAV2, poziom fluorescencji sugeruje, że dany neuron ulegał większej liczbie pojedynczych transdukcji. Również w porównawczej transdukcji siatkówki wektorem AAV2/5 i AAV2, wykazano 30-krotny wzrost liczby kopii transgeny/komórkę w przypadku wektora mozaikowego (YANG i współaut. 2002). Analogiczne wyniki uzyskano, badając

transdukcję istoty czarnej w mózgu wektorem AAV2/1 (McFARLAND i współaut. 2009, VAN DER PERRREN i współaut. 2011). Oba wektory mozaikowe cechuje znacząco większy, niż wektory dzikie, zakres rozchodzenia się i aktywnej transdukcji komórek struktur mózgu (hipokamp, istota czarna, prążkowie), choć, jednocześnie, cechuje je duża międzyosobnicza zmienność w poziomie transdukcji i/lub ekspresji transgenu, którą wykazano również w rdzeniu kręgowym (BURGER i współaut. 2004). Rozprzestrzenianie się transgenu może również być wynikiem ich transportu wstecznego, obserwowanego w przypadku mozaikowych, a nie wykrywanego w przypadku dzikich serotypów AAV (BURGER i współaut. 2004). To ważna cecha z punktu widzenia ich przydatności terapeutycznej. Przykładami zachodzenia transportu wstecznego są przypadki, w których podanie wektorów do mięśni sprawia, że produktami genu reporterowego znakują się motoneurony α w rdzeniu kręgowym (FOUST i współaut. 2008, HOLLIS i współaut. 2010). Prawdopodobną drogą rozpowszechnienia ekspresji

transgenu jest również transsynaptyczny, egzosomalny transport mRNA i/lub białka (SMALHEISER 2007, LACHENAL i współaut. 2011). Najnowsze badania nad skutecznością wektorów AAV o serotypach 1–6, przeprowadzone na naczelnym (małpa *Chlorocebus sabaeus*) wskazują na wektor AAV5, jako najskuteczniej infekujący komórki mózgu; przemawia za tym zarówno porównanie liczby komórek istoty czarnej i jądra ogoniastego, wyznakowanych białkiem reporterowym, jak też zdolność AAV5 do transdukowania neuronów i astrocytów (MARKAKIS i współaut. 2010). W badaniach własnych obserwowaliśmy, że AAV5 cechuje dobra wydajność transdukcji komórek rdzenia u myszy i szczurów. To, że większość badań podstawowych nad infekcyjnością AAV koncentruje się na takich strukturach mózgu, jak istota czarna i prążkowie, wskazuje wyraźnie, że medycyna poszukuje w pierwszej kolejności udoskonalonych narzędzi do terapii chorób zwyrodnieniowych, obejmujących te struktury, np. choroby Parkinsona.

ZWIĘKSZENIE SPECYFICZNOŚCI TKANKOWEJ I KOMÓRKOWEJ EKSPRESJI TRANSGENU NA POZIOMIE TRANSKRYPCYJNYM

Dobór odpowiedniego promotora pozwala na zawężenie ekspresji transgenu do specyficznych populacji komórkowych. Regulacja ta nie zawsze jest ścisła, ponieważ sekwencje ITR potrafią wykazywać niespecyficzną aktywność promotorową. W pierwszych latach badań nad terapią genową z użyciem AAV, ale także w przypadku innych nośników genów pochodzenia wirusowego, badacze zainteresowani byli maksymalizacją poziomu ekspresji transgenu. W tym celu wykorzystywano promotory (z powodzeniem używane do dziś), które pozwalały na konstytutywną ekspresję przenoszonego genu w wielu typach komórek. Do tego rodzaju sekwencji regulujących ekspresję, należą ludzki i mysz promotor wczesnych genów cytomegalowirusa (hCMV, mCMV) czy też promotor β -aktyny. Współcześnie, pomimo obaw związanych z obniżeniem wydajności ekspresji transgenu, dąży się do ograniczenia miejsca i czasu, w którym dochodzi do aktywacji ekspresji. W przypadku OUN, do najczęściej stosowanych należą obecnie promotory ograniczające/precyzujące ekspresję genów do specyficznej populacji komórkowej, np: promotor synapsyny człowieka (hSyn; specyficzny dla neuronów),

neuro-no-specyficznej enolazy (NSE), promotor CaMKII α (kinaza specyficzna dla neuronów glutaminianergicznych), GFAP (glejowe białko włóknikowe specyficzne dla astrocytów) (SHEVTSHOVA i współaut. 2005, KÜGLER i współaut. 2003). Współczesne wirusy II. generacji zawierają modyfikowane (przeważnie skracane) promotory o zwiększonej aktywności oraz indukowanej ekspresji (ZHU i współaut. 2007). Odrębną drogą „ewolucji” systemu transdukcji wykorzystującej wektory AAV są próby ominięcia, niezbędnej do wprowadzenia preparatu wirusowego do struktur ośrodkowego układu nerwowego, ingerencji chirurgicznej, która oprócz niebezpieczeństwa związanego z samą operacją (mikrouszkodzenia), może mieć znaczący wpływ na osobnicze różnice w wydajności transdukcji i ekspresji transgenu (okołooiniekcyjna reakcja zapalna eliminująca cząsteczki wektora, wpływ preparatu wzdłuż ścian kapilary iniekcyjnej). Wykazano skuteczność transdukcji zwojów grzbietowych (ang. Dorsal Root Ganglia, DRG) po podskórnym wstrzyknięciu wektora innego, niż AAV – wirusa pianistego człowieka (ang. Human Foamy Virus, HFV) (DZIAŁO i DEPTUŁA 2010), niosącego transgen dekarbok-

sylazy glutaminianowej (GAD67) i efektywność tej terapii w zmniejszaniu bólu neuropatycznego u szczurów (LIU i współaut. 2008). Z kolei XIE i współaut. (2011) po raz pierwszy zastosowali systemowe, dożylne podanie cząsteczek wektora (AAV9), który ma zdolność do pokonywania bariery krew-mózg, a w

sekwencjach regulatorowych zawiera mikro RNA, specyficznie degradujące mRNA transgenu poza układem nerwowym (aktywacja miRNA zależy od specyficznych fragmentów na 5' i 3' końcach mRNA transgenu). Porównanie cech AAV i innych wektorów wirusowych przedstawia Tabela 3.

Tabela 3. Porównanie cech AAV i innych wektorów pochodzenia wirusowego; zalety i wady najczęściej wykorzystywanych wektorów wirusowych do transferu genów.

AAV	Retrowirusy	Adenowirusy
• Niska immunogenność, defektywność replikacji • Mała pojemność DNA (4-4,5 kpz) • Stabilna i długotrwała ekspresja przenoszonych genów (lata) • Zmienna wydajność transdukcji (tkanka/ komórka/sposób podania) • Zdolność do infekcji wielu typów komórek różnych gatunków zwierząt; infekują zarówno komórki proliferujące jak i nieproliferujące. Szczególnie dobre wyniki uzyskuje się dla OUN, mięśni i płuc • Bardzo wysokie miano uzyskiwanych preparatów wirusowych (10^{12})	• Stabilna ekspresja przenoszonych genów (integracja z genomem gospodarza) • Transdukuje tylko komórki dzielące się	• Wysoka immunogenność • Brak związku z onkogennością u ludzi • Stosunkowo duża pojemność DNA (9 kpz) • Krótkotrwała ekspresja transgenu (tygodnie do miesięcy) • Wysokie miano uzyskiwanych preparatów wirusowych (10^{10})

AAV W PRÓBACH KLINICZNYCH CHOROÓB NEUROLOGICZNYCH

W przeprowadzonych dotychczas ponad 40 próbach klinicznych z użyciem wektorów AAV, najpowszechniej stosowano serotyp 2 wirusów AAV lub wirus o „mieszanej tożsamości“, skonstruowany na bazie genomu wektora AAV2 spakowanego do kapsydu AAV1 (AAV2/1). W poprzedzających je próbach doświadczalnych na zwierzętach wykazano bowiem jego dużą skuteczność w transdukowaniu komórek neuralnych gryzoni i naczelnych. Nie wyklucza to możliwości, że inne serotypy, mniej zbadane, mogą

być dobrymi kandydatami do zastosowań w klinice. W ciągu minionej dekady przeprowadzono szereg badań nad tropizmem i skutecznością transdukcji komórek wektorami AAV o różnych serotypach, wykorzystując do tych badań gryzonie (BURGER i współaut. 2004). Ale dopiero w 2009 roku badacze amerykańscy z uniwersytetu Yale'a w New Haven wspólnie z badaczami z Gene Therapy Center z Uniwersytetu Północnej Karoliny, przeprowadzili systematyczne badania na małpach, analizując skuteczność

transdukcji komórek neuralnych wektorami o serotypach 1–6. Wektory wstrzykiwano do mózgu małp *Chlorocebus sabaeus*, które żyją na wyspie St Kitts w archipelagu Wysp Karaibskich, są spokrewnione z afrykańską małpą zieloną i należą do grupy małp tzw. Starego Świata. Taki wybór jest ważny, gdyż są one najbliższymi krewnymi małp człekokształtnych i człowieka, a więc istnieje duże podobieństwo struktur mózgowych, jak też procesów biochemicznych i odpornościowych, które mogą wpływać na losy wirusa.

Wektory AAV do transferu genów są nie tylko bardzo skuteczne, ale również wyjątkowo bezpieczne klinicznie. Ponieważ genomy wektorów tego typu przeważnie nie integrują się z genomem komórki gospodarza, ich kancerogenność potencjał jest wyjątkowo niski w porównaniu, np., z wektorami lentiwirusowymi. Ponadto wektory AAV, po wprowadzeniu do ośrodkowego układu nerwowego, wywołują słabą lub nie wywołują żadnej reakcji układu odpornościowego, dlatego też spośród wszystkich stosowanych dotychczas nośników do transferu genów mają największe szanse na wprowadzenie ich do kliniki w celu leczenia chorób układu nerwowego (MANDEL i BURGER 2004, MCCOWN 2005, WARRINGTON i HERZOG 2006, TERZI i ZACHARIOU 2008). Z liczby 81 zaakceptowanych obecnie protokołów badań klinicznych (<http://www.abedia.com/wiley/index.html>), wykorzystujących technologię AAV, 11 przeszło już przez I fazę badań (ustalenie dawki bezpiecznej), a dla kolejnych dwunastu testowany jest obecnie zakres efektywności (faza II). Większość z przeszłych i obecnie przeprowadzanych badań klinicznych, posługuje się wirusami o serotypie 2.

W leczeniu chorób układu nerwowego najbardziej zaawansowane, wśród terapii z użyciem AAV, są próby leczenia chorób neurodegeneracyjnych: choroby Parkinsona (CHRISTINE i współaut. 2009), choroby Alzheimer (TUSZYŃSKI i współaut. 2005) oraz Huntingtona (KELLS i współaut. 2008). Nie mniej dynamicznie prowadzone są próby mające na celu rozwój terapii stwardnienia zanikowego bocznego (próba US-0380, www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/, HESTER i współaut. 2009); próba US-0380 i epilepsji (próba US-0669, www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/, NOE i współaut. 2007); próba US-0669. Wśród prób terapii chorób neurologicznych znajdujących się obecnie na II etapie badań przedklinicznych (n=6), najliczniej reprezentowana (n=4) jest próba terapii choroby Parkinsona z użyciem wektorów AAV2

kodujących neurturynę (NTN), neurotrofinę z rodziny czynników troficznych pochodzenia glejowego (ang. Glial Derived Neurotrophic factor, GDNF). Testowany preparat nosi nazwę CERE-120 (Ceregene, Inc., CA, USA). Mimo zachęcających wyników terapii polegającej na dostarczaniu czystego białka GDNF do komórek bocznych mózgu, próby z użyciem wektorów AAV2-NTN (US-0788, www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/), podawanych obustronnie do bocznej części jądra soczewkowatego, nie przyniosły wyraźnej poprawy (MARKS i współaut. 2010). Trwa rekrutacja pacjentów do kolejnego etapu badań fazy IIb. Równolegle do badań prowadzonych w USA, w Europie (Wielka Brytania, Szwecja, Hiszpania) realizowane są trzy podobne programy kliniczne, w których działanie preparatu CERE-120 wzmacnia się stosowaniem innych leków. Dostępny jest protokół kliniczny leczenia, natomiast nie opublikowano dotychczas wyników terapii.

Firma Ceregene Inc., prowadzi próbę, która ma na celu zwiększenie przeżywalności neuronów jąder podstawnych w chorobie Alzheimera (US-0623, www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/). W tym celu wektory AAV2, kodujące inną neurotrofinę – czynnik wzrostu nerwów (ang. Nerve Growth Factor, NGF) (CERE-110-03), podawane są do jądra podstawnego wielkomórkowego kresomózgowia (j. Meynerta).

Ostatnia z prób znajdujących się na II etapie badań, testujących terapię genową z użyciem wektorów AAV, ponownie dotyczy choroby Parkinsona. Jest ona realizowana przez firmę Neurologix Inc., NJ, USA i opiera się na odmiennej strategii. W celu opanowania uciążliwych dla pacjenta ruchów mimowolnych i poprawienia funkcji jąder podstawnych, wektory AAV2 kodujące dekarboksylazę kwasu glutaminowego (GAD65; enzym, katalizujący powstawanie neuroprzekaźnika hamulcowego GABA), podawane są do jądra niskowzgórzowego, zwiększając jego przekazywanie hamulcowe (NCT00643890). Znacząca poprawa funkcji w znormalizowanych testach do badania funkcji ruchowych (ang. Unified Parkinson Disease Rating Scale, UPDRS), wykazana u pacjentów, którym podano preparat wirusowy (LEWITT i współaut. 2011), dowiodły skuteczności zastosowanego podejścia, rozbudzając nadzieję na postęp w leczeniu tej choroby. Wybór prób klinicznych z użyciem wektorów wirusowych przedstawia Tabela 4.

Celem działań, które umożliwiają dostarczenie wektorów wirusowych do mózgu jest

Tabela 4. Próby kliniczne z użyciem wektorów wirusowych do leczenia schorzeń neurologicznych.

Firma	Terapia	Wskazania	Faza badania
Retrowirusy			
Neurologix	NLX-P101: Transgen GAD (ang. Glutamic Acid Decarboxylase - dekarboksylaza kwasu glutaminowego) w wirusie wstrzykiwanym do jądra podwzgórzowego mózgu	Choroba Parkinsona	Faza 2
Tocagen San Diego	Toca-511: kompetentny replikacyjnie wektor retrowirusowy z sekwencją kodującą deaminazę cytozyny, aktywatora prekursora leku, wstrzykiwany do guza	Glejak	Faza 1/2
Lentiwirusy			
Oxford BioMedica	ProSavin: lentiwirus z sekwencjami kodującymi trzech genów potrzebnych w syntezie dopaminy, wstrzykiwany do prądkowia mózgu	Choroba Parkinsona	Faza 1/2
Adenowirusy			
Advantagene Auburndale, MA, USA	ADV-tk: Niezdolny do replikacji adenowirus z sekwencją kodującą kinazę tymidynową z HSV (ang. Herpes Simplex Virus), wstrzykiwany do guza podczas biopsji	Glejak	Faza 1
Biogen	Adenowirus z sekwencją kodującą β -interferon	Glejak	Faza 1/2
Ceregene San Diego	CERE-120: AAV (ang. Adeno-associated virus - wirus stowarzyszony z adenowirusem) z sekwencją kodującą czynnik neurotroficzny, neurturin, wstrzykiwany w obszar obumierających neuronów istoty czarnej mózgu Cere-110: AAV z sekwencją kodującą NGF (ang. Nerve Growth Factor – czynnik wzrostu nerwów), wstrzykiwany do rejonów mózgu o dużym skupieniu neuronów cholinergicznym (jądro Meynerta)	Choroba Parkinsona Choroba Alzheimer	Faza 1/2 Faza 1/2
Inne			
Diamyd Medical Stockholm, Sweden	System podawania leku naczelniany na nerwy: wektor HSV z enkefaliną	Ból	Faza 1

minimalizacja uszkodzeń i zaburzeń funkcji w trakcie wprowadzania genu. Wektory, które zasiedlają dużą przestrzeń penetrowanej tkanki i które cechuje tropizm

do określonego, pożądanego typu komórek, są szansą na dostarczenie najmniejszej możliwej ilości wektora, która jednocześnie zapewni maksymalną dostawę genu.

PODSUMOWANIE

Dotychczasowe terapie eksperymentalne z użyciem wektorów wirusowych są obiecujące. Również próby kliniczne drugiej fazy

niosą nadzieję, że terapie będą skuteczne. Ale mają one wciąż ograniczenia. Są sytuacje, w których chcielibyśmy mieć możliwość

kontrolowania „fabryczek” białek, zmniejszania dopływu substancji aktywnych a nawet „zamknięcia kranu”. W przypadkach, gdy przedmiotem naszych działań powinna być bardzo mała grupa komórek, a pobudzenie sąsiednich komórek może przynieść efekty niepożądane, stajemy się bezradni. Dlatego naukowcy sięgają dalej w poszukiwaniach.

W 1979 r. Francis Crick, odkrywca kodu DNA, powiedział, że neurobiologia potrzebuje techniki, która pozwoliłaby kontrolować wybrane grupy komórek, pozostawiając inne „w spokoju”. Mózg jest zbiorem komórek pobudzanych elektrycznie, a nie tylko chemicznie. Dotychczasowe próby zrealizowania myśli Cricka, które polegały na elektrycznym pobudzaniu struktur mózgu, nie przyniosły

spodziewanych efektów, gdyż powodują rozprzyszczenie elektryczności. Zaczęto więc szukać sposobów by neurony wyłączać i włączać tak, jak włącza się światło. Wynikiem tych prac jest technologia nazwana optogenetyką (DEISSE-ROTH 2011). Tutaj biolodzy sięgnęli po opsyny, białka organizmów jeszcze prostszych niż meduza. Białka te pełnią rolę receptorowych kanałów jonowych, a ich pobudzenie wiązką światła, prowadzi do pobudzenia lub zahamowania czynności neuronu. Ponieważ opsyny są obce dla organizmów ssaczych i większość komórek ssaków jest niewrażliwa na światło, technika umożliwia precyzyjną kontrolę wybranych grup komórek. I tutaj wektory wirusowe są narzędziem, które wprowadza opsyny do komórki nerwowej.

OBLASKAWIONE WIRUSY W SŁUŻBIE NAUKI I MEDYCYNY

Streszczenie

Wirusy są, w powszechnym rozumieniu, chrobotwórczymi czynnikami, zbliżonymi do bakterii. W różnym stopniu szkodliwe dla zdrowia człowieka, zarażają go, aby – nie mając zdolności do samodzielnego rozmnażania się – wykorzystać komórki gospodarza do rozplemu. Traktują więc obcy organizm jak swoistą wylęgarnię. Mali i groźni najeźdźcy. Ale dla naukowców, którzy poszukują skutecznych metod terapeutycznych, wirusy to znakomite nośniki i dostarczyciele genów, które w toku ewolucji nabyły zdolność wydajnego przenoszenia własnego materiału genetycznego do obcych komórek. By móc je wykorzystywać bez ryzyka, trzeba je obłaskawić. W laboratoriach pozbawia się je zdolności do namnażania się lub modyfikuje tak, by zachowały zdolność atakowania i niszczenia komórek nowotworowych, nie uszkadzając komórek zdrowych. Tak zmienione cząstki wirusów, przenoszące pożądane geny, nazwano wektorami wirusowymi. Użytecznymi wektorami mogą być tylko te wirusy, które tolerują w swoim materiale genetycznym wprowadzone, obce geny, i które ce-

kuje duża wydajność infekcji. Tylko niektóre typy wirusów spełniają te warunki. Są między nimi retrowirusy, adenowirusy i parwowirusy „stowarzyszone” z adenowirusami; tzw. dependowirusy (ang. adeno-associated virus, AAV). Te ostatnie zasługują na szczególną uwagę, gdyż bez wsparcia towarzyszącego im adenowirusa nie potrafią się namnażać i są nieszkodliwe dla człowieka. To właśnie ich obłaskawione formy okazały się obiecującym narzędziem w próbach leczenia chorób zwyrodnieniowych układu nerwowego. To narzędzie próbuje się wykorzystywać również do ochrony komórek nerwowych i poprawy ich funkcji po uszkodzeniach.

Artykuł wprowadza czytelnika w świat wektorów wirusowych, opisuje sposoby ich konstruowania i użycia w doświadczalnych terapiach zaburzeń, wywołanych uszkodzeniami mózgu i rdzenia kręgowego. Przytoczono najnowsze dane na temat skuteczności i perspektyw prób klinicznych terapii genowych oraz użycia tych nośników w optogenetyce.

TAMED VIRUSES SERVE SCIENCE AND MEDICINE

Summary

Viruses may be used in science and medicine as efficient carriers and gene suppliers to various organs and tissues. They developed the ability to invade alien cells for self propagation with the use of the genome of the host. To use them with no risk, the scientists have to tame them. That is achieved by removal of the majority of their genes, including the genes responsible for replication. The modified viral particles are subjected to genetic modification of the viral capsid aimed to increase its infectivity and to target a virus to the specific cell. After introduction of the therapy-targeted genes they become viral vectors. Not all vi-

ruses can be used as vectors; among those which are safe for humans and cause a long-term transduction are adeno-associated viruses AAV, promising for human somatic gene therapy. Till now, experimental therapies carried out with AAV-based vectors have shown improvement of function following brain and spinal cord injuries in rats. Such vectors are currently used in clinical trials of Parkinson and Alzheimer diseases. In basic science, AAV vectors have been recently used to transduce neurons with opsins, receptor channel proteins sensitive to light and able to convert a photon light into an electrochemical signal. They become

a promising tool in optogenetics, an emerging field in neuroscience which allows to investigate

changes in function of neuronal circuits after light-induced or inhibited activity of a single cell.

LITERATURA

- BERNS K. I., 1990. *Parvovirus replication*. Microbiol. Rev. 54, 316–329.
- BURGER C., GORBATYUK O. S., VELARDO M. J., PEDEN C. S., WILLIAMS P., ZOLOTUKHIN S., REIER P. J., MANDEL R. J., MUZYCZKA N., 2004. *Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system*. Mol. Ther. 10, 302–317.
- BÜNING H., PERABLO L., COUTELLE O., QUADT-HUMME S., HALLEK M., 2008. *Recent developments in adeno-associated virus vector technology*. J. Gene Med. 10, 717–733.
- CHRISTINE C. W., STARR P. A., LARSON P. S., EEBERLING J. L., JAGUST W. J., HAWKINS R. A., VANBROCKLIN H. F., WRIGHT J. F., BANKIEWICZ K. S., AMINOFF M. J., 2009. *Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease*. Neurology 73, 1662–1669.
- DEISSEROTH K., 2011. *Optogenetics*. Nat. Methods. 8, 26–29.
- DZIAŁO J., DEPTUŁA W., 2010. *Systematyka wirusów kręgowców – aktualne dane*. Kosmos 59, 435–449.
- FERRARI F. K., SAMULSKI T., SHENK T., SAMULSKI R. J., 1996. *Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors*. J. Virol. 70, 3227–3234.
- FOUST K. D., POIRIER A., PACAK C. A., MANDEL R. J., FLOTTE T. R., 2008. *Neonatal intraperitoneal or intravenous injections of recombinant adeno-associated virus type 8 transduce dorsal root ganglia and lower motor neurons*. Human Gene Ther. 19, 61–70.
- GRAHAM F. L., SMILEY J., RUSSELL W. C., NAIRN R., 1977. *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J. Gen. Virol. 36, 59–74.
- GRIMM D., KERN A., RITTNER K., KLEINSCHMIDT J. A., 1998. *Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors*. Human Gene Ther. 9, 2745–2760.
- HERMONAT P. L., MUZYCZKA N., 1984. *Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells*. PNAS 81, 6466–6470.
- HESTER M. E., FOUST K. D., KASPAR R. W., KASPAR B. K., 2009. *AAV as a gene transfer vector for the treatment of neurological disorders: novel treatment thoughts for ALS*. Curr. Gene Ther. 9, 428–433.
- HOLLIS E. R., 2nd, JAMSHIDI P., LORENZA A. O., LEE J. K., GRAY S. J., SAMULSKI R. J., ZHENG B., TUSZYŃSKI M. H., 2010. *Transient demyelination increases the efficiency of retrograde AAV transduction*. Mol. Ther. 18, 1496–1500.
- JAŻWA A., RUTKOWSKI A., GOŁDA S., REHHAHN R., JÓZKOWICZ A., DULAK J., 2007. *Optymalizacja otrzymywania wektorów AAV*. Biotechnologia 3, 141–156.
- KELKAR S., DE B. P., GAO G., WILSON J. M., CRYSTAL R. G., LEOPOLD P. L., 2006. *A common mechanism for cytoplasmic dynein-dependent microtubule binding shared among adeno-associated virus and adenovirus serotypes*. J. Virol. 80, 7781–7785.
- KELLS A. P., HENRY R. A., CONNOR B., 2008. *AAV-BDNF mediated attenuation of quinolinic acid-induced neuropathology and motor function impairment*. Gene Ther. 15, 966–977.
- KÜGLER S., LINGOR P., SCHOLL U., ZOLOTUKHIN S., BAHR M., 2003. *Differential transgene expression in brain cells in vivo and in vitro from AAV-2 vectors with small transcriptional control units*. Virology 311, 89–95.
- LACHENAL G., PERNET-GALLAY K., CHIVET M., HEMMING F. J., BELLY A., BODON G., BLOT B., HAASE G., GOLDBERG Y., SADOUL R., 2011. *Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity*. Mol. Cell. Neurosci. 46, 409–418.
- LEWITT P. A., REZAI A. R., LEEHEY M. A., OJEMANN S. G., FLAHERTY A. W., ESKANDER E. N., KOSTYK S. K., THOMAS K., SARKAR A., SIDDIQUI M. S., TATTER S. B., SCHWALB J. M., POSTON K. L., HENDERSON J. M., KURLAN R. M., RICHARD I. H., VAN METER L., SAPAN C. V., DURING M. J., KAPLITT M. G., FEIGIN A., 2011. *AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial*. Lancet Neurol. 10, 309–319.
- LIU W., LIU Z., XIAO Z., CAO X., CAO Z., XUE L., MIAO L., HE X., LI W., 2008. *A novel human foamy virus mediated gene transfer of GAD67 reduces neuropathic pain following spinal cord injury*. Neurosci. Lett. 432, 13–18.
- LUX K., GOERLITZ N., SCHLEMMINGER S., PERABO L., GOLDNAU D., ENDELL J., LEIKE K., KOFLER D. M., FINKE S., HALLEK M., BÜNING H., 2005. *Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking*. J. Virol. 79, 11776–11787.
- MANDEL R. J., BURGER C., 2004. *Clinical trials in neurological disorders using AAV vectors: promises and challenges*. Curr. Opin. Mol. Ther. 6, 482–490.
- MANI B., BALTZER C., VALLE N., ALMENDRAL J. M., KEMPF C., ROS C., 2006. *Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome*. J. Virol. 80, 1015–1024.
- MARKAKIS E. A., VIVES K. P., BOBER J., LEICHTLE S., LERANTH C., BEECHAM J., ELSWORTH J. D., ROTH R. H., SAMULSKI R. J., REDMOND D. E. JR., 2010. *Comparative transduction efficiency of AAV vector serotypes 1–6 in the substantia nigra and striatum of the primate brain*. Mol. Ther. 18, 588–593.
- MARKS W. J. JR., BARTUS R. T., SIFFERT J., DAVIS C. S., LOZANO A., BOULIS N., VITEK J., STACY M., TURNER D., VERHAGEN L., BAKAY R., WATTS R., GUTHRIE B., JANKOVIC J., SIMPSON R., TAGLIATI M., ALTERMAN R., STERN M., BALTUCH G., STARR P. A., LARSON P. S., OSTREM J. L., NUTT J., KIEBURTZ K., KORDOWER J. H., OLANOW C. W., 2010. *Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial*. Lancet Neurol. 9, 1164–1172.
- MCCOWN T. J., 2005. *Adeno-associated virus (AAV) vectors in the CNS*. Curr. Gene Ther. 5, 333–338.

- McFARLAND N.R., LEE J.S., HYMAN B.T., McLEAN P.J., 2009. Comparison of transduction efficiency of recombinant AAV serotypes 1, 2, 5, and 8 in the rat nigrostriatal system. *J. Neurochem.* 109, 838–845.
- NOE F., NISSINEN J., PITKANEN A., GOBBI M., SPERK G., DURING M., VEZZANI A., 2007. *Gene therapy in epilepsy: the focus on NPY*. *Peptides* 28, 377–383.
- PADRON E., BOWMAN V., KALUDOV N., GOVINDASAMY L., LEVY H., NICK P., MCKENNA R., MUZYCZKA N., CHIORINI J. A., BAKER T. S., AGBANDJE-MCKENNA M., 2005. Structure of adeno-associated virus type 4. *J. Virol.* 79, 5047–5058.
- SAMULSKI R.J., SRIVASTAVA A., BERNIS K.I., MUZYCZKA N., 1983. Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV. *Cell* 33, 135–143.
- SHEVTSOVA Z., MALIK J. M., MICHEL U., BAHR M., KÜGLER S., 2005. Promoters and serotypes: targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system in vitro and in vivo. *Exp. Physiol.* 90, 53–59.
- SMALHEISER N. R., 2007. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biol. Direct.* 2, 35.
- SONNTAG F., BLEKER S., LEUCHS B., FISCHER R., KLEINSCHMIDT J. A., 2006. Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J. Virol.* 80, 11040–11054.
- SONNTAG F., SCHMIDT K., KLEINSCHMIDT J. A., 2010. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 107, 10220–10225.
- SONNTAG F., KOTHER K., SCHMIDT K., WEGHOFFER M., RAUPP C., NIETO K., KUCK A., GERLACH B., BOTCHER B., MÜLLER O. J., LUX K., HORER M., KLEINSCHMIDT J. A., 2011. The assembly-activating protein promotes capsid assembly of different adeno-associated virus serotypes. *J. Virol.* 85, 12686–12697.
- TERZI D., ZACHARIOU V., 2008. Adeno-associated virus-mediated gene delivery approaches for the treatment of CNS disorders. *Biotechnol. J.* 3, 1555–1563.
- TUSZYŃSKI M. H., THAL L., PAY M., SALMON D. P., U H. S., BAKAY R., PATEL P., BLESCH A., VAHLSING H. L., HO G., TONG G., POTKIN S. G., FALLON J., HANSEN L., MUFSON E. J., KORDOWER J. H., GALL C., CONNER J., 2005. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat. Med.* 11, 551–555.
- VAN DER PERREN A., TOELEN J., CARLON M., VAN DEN HAUTE C., COUN F., HEEMAN B., REUMERS V., VANDENBERGHE L. H., WILSON J. M., DEBYSER Z., BAEKELANDT V., 2011. Efficient and stable transduction of dopaminergic neurons in rat substantia nigra by rAAV 2/1, 2/2, 2/5, 2/6.2, 2/7, 2/8 and 2/9. *Gene Ther.* 18, 517–527.
- WARRINGTON K. H. JR., HERZOG R. W., 2006. Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum. Genet.* 119, 571–603.
- WU Z., ASOKAN A., SAMULSKI R. J., 2006. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol. Ther.* 14, 316–327.
- XIAO X., LI J., SAMULSKI R. J., 1998. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.* 72, 2224–2232.
- XIE Q., BU W., BHATIA S., HARE J., SOMASUNDARAM T., AZZI A., CHAPMAN M. S., 2002. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 16, 10405–10410.
- XIE J., XIE Q., ZHANG H., AMERES S. L., HUNG J. H., SU Q., HE R., MU X., SEHER AHMED S., PARK S., KATO H., LI C., MUELLER C., MELLO C. C., WENG Z., FLOTTE T. R., ZAMORE P. D., GAO G., 2011. MicroRNA-regulated, systemically delivered rAAV9: a step closer to CNS-restricted transgene expression. *Mol. Ther.* 19, 526–535.
- YANG G. S., SCHMIDT M., YAN Z., LINDBLOOM J. D., HARDING T. C., DONAHUE B. A., ENGELHARDT J. F., KOTIN R., DAVIDSON B. L., 2002. Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J. Virol.* 76, 7651–7660.
- ZHU P., ALLER M. I., BARON U., CAMBRIDGE S., BAUSEN M., HERB J., SAWINSKI J., CETIN A., OSTEN P., NELSON M. L., KÜGLER S., SEEBURG P. H., SPRENGEL R., HASAN M. T., 2007. Silencing and un-silencing of tetracycline-controlled genes in neurons. *PLoS One* 2, e533.
- ZOLOTUKHIN S., BYRNE B. J., MASON E., ZOLOTUKHIN I., POTTER M., CHESNUT K., SUMMERFORD C., SAMULSKI R. J., MUZYCZKA N., 1999. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* 6, 973–985.