

ACTA MYGENICA

nr 2 2010



Zeszyt Koła Naukowego
Studentów Biotechnologii Mygen

Kraków 2010

ACTA MYGENICA

nr 2 2010

Zeszyt Koła Naukowego
Studentów Biotechnologii Mygen

Redakcja:

Krzysztof Szade – redaktor naczelny

Agata Szade

Barbara Zięba

Joanna Bereta

Projekt okładki:

Agata Szade

Skład:

Agata Szade

Krzysztof Szade

Korekta:

Zespół redakcyjny

Wydawnictwo:

AT Group Sp. z o.o.,
ul. Łokietka 48, 31-334 Kraków

Nakład:

100 egzemplarzy

Kontakt: krzysztof.szade@uj.edu.pl

ISSN: 1899-5535

SPIS TREŚCI

Wstęp:

Od redakcji <i>Krzysztof Szade</i>	5
Wspomnienie dr Michała Berety	6

Aktualności:

I Rajd Biotechnologa – sprawozdanie <i>Krzysztof Krawczyk</i>	9
Druga niemiecko-polska konferencja naukowa „German/Polish LifeScience Meeting” <i>Lukasz Skalniak</i>	12

Felieton:

Nauka czy fikcja? Oszustwa w nauce. <i>Lukasz Skalniak</i>	15
---	----

Artykuły:

Wykorzystanie macierzy PSSM w poszukiwaniu sekwencji odpowiadających na węglowodany (ChRE) <i>Rafał Gumienny</i>	19
Rola wybranych genów homeotycznych i morfogenów w procesach neurogenezy i rozwoju szkieletu czaszkowego kręgowców na przykładzie myszy <i>Magda Filip</i>	28
HCV – zmora naszych czasów <i>Jan Korbecki</i>	37
MikroRNA – znaczenie w terapii genowej <i>Kamil Kruczek</i>	48
Wykorzystanie wektorów AAV w terapii genowej. Próby kliniczne <i>Jacek Stępniewski</i>	63
Heme-oxygenase 1 versus carcinogenesis <i>Małgorzata Sokołowska</i>	76

OD REDAKCJI

Oddajemy do rąk Czytelników drugi numer „Acta Mygenica” redagowany przez Koło Naukowe Studentów Biotechnologii Mygen.

W tym numerze Autorzy artykułów kierują naszą uwagę na kilka różnych zagadnień z szeroko pojętej dziedziny biologii molekularnej i biotechnologii. Wszystkich zainteresowanych potencjałem metod bioinformatycznych zachęcam do zapoznania się z artykułem prezentującym wykorzystanie macierzy do poszukiwania specyficznych sekwencji w obrębie promotorów. Kolejne artykuły pozwolą nam poznać rolę poszczególnych genów w procesach neurogenezy, a także zgłębić wiedzę o wirusie HCV będącym ciągle poważnym problem medycznym i społecznym. Będziemy się mogli dowiedzieć jak obecną wiedzę o mikroRNA i wirusach AAV próbuję się wykorzystać w terapii genowej oraz o niejednoznacznej roli enzymu oksygenazy hemowej w karcynogenezie.

Jako studenci koła naukowego mamy świadomość, że prowadzenie badań naukowych musi koniecznie odbywać się w sposób bezwzględnie rzetelny i obiektywny. Polecam ciekawy felieton traktujący o fatalnych skutkach niezachowania tych nieodłącznych nauce reguł.

Nie zabrakło podsumowań działań i inicjatyw podjętych przez Członków Koła, które publikujemy w dziale Aktualności.

Z pewnością obecny ani poprzedni numer Acta Mygenica nie powstałby, gdyby nie zaangażowanie studentów biotechnologii należących do Koła Mygen. To zaangażowanie, naukową pasję, dociekliwość jak również chęć poznawania molekularnego świata w dużej mierze zawdzięczamy naszemu pierwszemu opiekunowi i inicjatorowi powstania Koła Mygen – śp. Doktorowi Michałowi Berecie. Z wielkim bólem przyjęliśmy jego odejście. Dziękujemy za wszystko czego nas nauczył i będziemy się starać wykorzystać to w naszej naukowej działalności.

redaktor wydania
Krzysztof Szade

WSPOMNIENIE DR MICHAŁA BERETY



30 listopada 2008 roku odszedł od nas nagle Doktor Michał Bereta - inicjator oraz pierwszy opiekun naukowy Koła Naukowego Studentów Biotechnologii Mygen.

Cieężko jest pisać w czasie przeszłym o kimś, dla kogo życie na najwyższych obrotach było tak naturalne, jak samo oddychanie. Doktor Michał zawsze się spieszył, zawsze miał coś do zrobienia, zawsze miał głowę pełną nowych pomysłów. Zawsze żył tu i teraz i cieszył się terażniejszością.

Był naszym pierwszym przewodnikiem po świecie biologii molekularnej. Był pierwszym, który na studiach pozwolił nam własnoręcznie dokonywać „odkryć”. Był tym, który pozwolił nam uwierzyć we własne siły i możliwości. Nauczył nas nie tylko podstawowych technik laboratoryjnych, ale również tego, jak powinien zachowywać się naukowiec – bycia dociekliwym i bronięcia własnych teorii. Pamiętam, gdy raz podeszłam do Niego po jednym z mygenowych seminariów i poprosiłam o podanie mi nazwiska pierwszego autora publikacji, którą wcześniej zacytował - roześmiał się i odpowiedział: „Wymyśliłem ten papier!”. Gdy później poszukałam w PubMedie, okazało się, że jednak ktoś takie dane opublikował, choć On o tym nie wiedział i kierował się tylko własną intuicją, która jest nieodzowną cechą prawdziwego odkrywcy. Zawsze stawiał czoła stereotypom i uczył nas niezależnego, twórczego

myślenia. Często w dyskusjach odgrywał rolę „advokata diabła” – wygłaszał kontrowersyjne teorie i opinie, w które niekoniecznie sam wierzył, po to tylko, aby wywołać naszą reakcję, aby zmusić nas do myślenia.

Był jednym z tych nielicznych wykładowców w dawnym IBMie, którzy nie wytwarzali bariery pomiędzy sobą a studentami. I może właśnie dzięki temu kumpelskiemu podejściu, tej energii, którą emanował w labie, był dla nas prawdziwym autorytetem. Właściwie ważniejszym było dla nas usłyszeć od Doktora Michała, że "jest się dobrym w te klocki" od najlepszych ocen w indeksie.

Uczył nas poprzez swój przykład i swoje doświadczenie. Lubił podejmować wyzwania i stawiać wyzwania innym. Zawsze myślał niesablonowo, nie wahał się podważać autorytety. Zawsze był sobą, zawsze i w każdej mierze był wolnym człowiekiem. Na zawsze pozostanie dla nas jednym z niewielu ludzi, których spotkanie odmieniło nasze losy.

I jeszcze na koniec chciałabym dodać kilka słów od Koła Mygen, które narodziło się z inicjatywy Doktora Michała. Obecni członkowie Koła Mygen poznali Doktora na jubileuszowym wyjeździe do Mszany Dolnej z okazji 10-lecia istnienia Koła i również na nich wywarł On niezwykle wrażenie swoją bezpośredniością i pasją. Studenci zaangażowani w działalność Mygenu obiecują dołożyć wszelkich starań, aby pamięć o Doktorze nie umarła oraz aby jego idee były wciąż żywe i realizowane przez kolejne pokolenia młodych biotechnologów wychowywanych przez UJ.

Napisane w imieniu studentów Biotechnologii UJ, w szczególności z roczników 2000 i 2001, w imieniu wszystkich studentów, którzy mieli zaszczyt pracować z Doktorem Michałem Beretą, oraz w imieniu wszystkich byłych i obecnych członków Koła Mygen.

zebrała **Ilona Rafalska-Metcalf**

Michał miał niebywały głód kreowania. Ale materia, którą najczęściej w swoich kreacjach używał byliśmy my – studenci. Faktem jest, że było w nas mnóstwo entuzjazmu, ciekawości i pasji, ale potrafił na niej nie tylko bazować, ale i ją umiejętnie zamplifikować. Zapalał nas do działania, rozpalał w nas marzenia, ale zdecydowanie dążył do realizacji swoich pomysłów. Mygen jak i pokój 113 ukształtowały we mnie, i myślę w wielu z nas „kręgosłup” tego, czym jest, a może nawet czym być powinna NAUKA w tej najczystszej, nieskalanej formie. Zaraził mnie świadomie ideałem, ideałem którego nie da się wyleczyć. A jako nosiciel, bezwzględnie rozsiewam i głoszę z wielką dumą. Michał żył niebywałym tempem i ono nadawało jego życiu smak. Bywał

trochę niemożliwy, ale dzięki temu był bardziej zjadliwy, bardziej po naszej, studentów stronie. Przy nim nie czuło się że jest wykładowcą, nie wytwarzał sztucznych barier, był jednym z nas.

Rzucał rękawicę wyzwań wprost nałogowo. I nie tylko sobie, ale i ludziom, którzy go otaczali. A robił to z takim naturalnym zrozumieniem potencjału, jaki drzemie w każdej pojedynczej jednostce, że potrafił wyłuskać z człowieka więcej niż sam siebie mógłby posądzać. Budował swój autorytet, nie przez tytułarność i formy oddziaływania z ludźmi, ale przez rzeczywistą wiedzę, niezwykle wszechstronną wiedzę i niebywałe doświadczenie. Tryskała z niego nie jakaś encyklopedyczna erudycja, ale pewna, czasami niezrozumiała, instynktowna synteza tego co w sobie zakumulował. Michał uwielbiał wykraczać poza przyjęte kanony. Uczył nas najgorszych „przestępstw”, uczył jak łamać reguły, wychodzić poza ramy. To świadczyło o prawdziwej sile, bitności, co było naturalną potęgą jego charakteru, ale zawsze emitował to w swoisty sposób. Trudno nawet go opisać, ale był to Michałowy sposób.

Jak to napisał Oscar Wilde:

„Wszyscy leżymy w rynsztoku, ale niektórzy z nas sięgają po gwiazdy.”

Michał nie tylko po nie sięgał, ale uczył nas jak rwać garściami (i nie egoistycznie) te gwiazdy. Dziękuję ci Michale za to, i za wiele, wiele więcej. Gdybyś był z nami naruszylibyśmy jeszcze nie jedną konstelację i zmienili mapę nieba niejednokrotnie.

Adam Lasek

SEN O MICHALE

Widziałam Go siedzącego w starodawnym, kwiecistym fotelu, który był ustawiony w przestronnym, jasnym, prawie pustym pokoju. Michał patrzył przez olbrzymie okna na zewnątrz (jakby podwórko, a może ogrody?), a jasność, czystość, która otaczała to miejsce, jest trudna do opisanie. Na moje pytania odpowiadał uśmiechem. Był bardzo zadowolony. Następna "klatka" - to spacer aleją obrośniętą pięknymi drzewami. Widzę Michała przechodzącego pod olbrzymim starym dębem (chyba), tak, że dotyka głową gęsto ulistnionych gałęzi tego drzewa i tak jak przedtem, piękny uśmiech jest odpowiedzią na moje pytanie...

Teresa Domanski

Krzysztof Krawczyk

I RAJD BIOTECHNOLOGA – SPRAWOZDANIE

Pomysł zorganizowania Rajdu Biotechnologa narodził się dawno, nie pamiętam w czyjej głowie. Jednak każdy pomysł bez ludzi chcących go realizować jest stworzeniem bardzo delikatnym i źle radzi sobie na wolności. Podczas jesiennej „Mszany” wraz z Pawłem Nowakiem postanowiliśmy, że podejmiemy się zadania i rajd zorganizujemy. Wstępny termin ustaliliśmy na koniec semestru letniego i zabraliśmy się do planowania. Aby przygotowaniom nadać większej pompy, postanowiliśmy nawiązać współpracę z Samorządem Studentów na naszym Wydziale. Uzgodniliśmy, że rajd będzie miał charakter wyjazdu integracyjno-konferencyjnego. Jako że mieliśmy się przemieszczać pieszo z miejsca na miejsce, zrezygnowaliśmy z prezentacji multimedialnych. W miarę upływu czasu, przygotowania wydawały się iść zgodnie z planem. Mieliśmy fundusze, zarezerwowane noclegi i transport, koszulki z radosnym logiem, prelegentów i listę uczestników. Nie obyło się jednak bez mrozących krew w żyłach niespodzianek. Zostały one jednak przezwyciężone dzięki pomocy Dziekana WBBiB. Nie były to jednak, jak się okazało, niespodzianki ostatnie...



Fot. 1 Maskotka rajdowa autorstwa Justyny Szlechty



Fot. 2 „No to ruszamy...”
(fot. Jarosław Surkont)

Figła postanowiła spłatać nam pogodę. Niefortunnym zbiegiem okoliczności w noc poprzedzająca nasz wyjazd nad Małopolską przetoczyły się ulewę. Przestraszyły one kilku uczestników, którzy nie pojawili się na punkcie zbiórki. Gdy spotkaliśmy się rano na dworcu, okazało się, że pociąg, który miał nas zawieźć do Rytra został odwołany. Nie zraziło nas to i postanowiliśmy dotrzeć na miejsce autobusem.

Przecież byle powódź nas nie zatrzyma... Radość opuściła nas jeszcze na chwilę, gdy okazało się, że przez drogę do Nowego Sącza przelewa się woda. Na szczęście autobus powoli przesuwiał się do przodu, brodząc aż po luki bagażowe. Koło południa dotarliśmy w rejon startu i ruszyliśmy na szlak. Pozostało jeszcze tylko znaleźć przejezdny most, ale i z tym sobie poradziliśmy. Po kilku godzinach dotarliśmy wreszcie do Chaty Górskiej „Cyrła”. Pełni wrażeń, zasiedliśmy przy ognisku, aby cieszyć się z pokonanych przeszkód oraz wyrażać spontaniczną, niczym niespowodowaną radość.



Fot. 3 Chodzenie po górach wzmacnia apetyt
(fot. Krzysztof Krawczyk)

umiarkowane, dlatego wielu korzystało z okazji do zrobienia zdjęcia. Późnym popołudniem dotarliśmy do schroniska. Czym prędzej przystąpiliśmy do części konferencyjnej. Sesję otworzył **dr Benedykt Władyka**, który opowiedział historię pionierskiej pracy o badaniu działania miejsc wiążących substrat w enzymach proteolitycznych. Następnie **Krzysztof Krawczyk** wygłosił prezentację pt.: „Gdzie się podziela współczesna eugenika, czyli jak stać się lepszym człowiekiem”, w której podsumował współczesne i przyszłe metody ulepszania ciała ludzkiego. Kolejnym prelegentem był **Jarosław Surkont**. Poprowadził on dyskusję nt. oprogramowania *open source*. Panel zakończył **Sebastian Pintscher**. Opowiedział, w jaki sposób literatura science-fiction wpływała na rozwój prawdziwej nauki, stanowiąc dlań inspirację. Dzień zakończył się ogniskiem, na którym jednym z wielu diskutowanych tematów

Dzień drugi Rajdu rozpoczął się od prelekcji **Pawła Nowaka** na temat geografii oraz przyrody Beskidu Sądeckiego. Po prezentacji, około godziny dziesiątej wyruszyliśmy na kilkugodzinną trasę: poprzez Halę Łabowską do schroniska Wierchomla. Droga mijała w sielankowej atmosferze, zwłaszcza, że pogoda już dopisywała. Tempo było



Fot. 4 Bo czasem trzeba zwolnić... ;)
(fot. Krzysztof Krawczyk).

była definicja obrotu wokół własnej osi na przykładzie ciał niebieskich.

W niedzielę grupa rajdowa udała się do Krynicy, skąd każdy powrócił do miejsca zamieszkania. **I Rajd Biotechnologa** oficjalnie dobiegł końca.



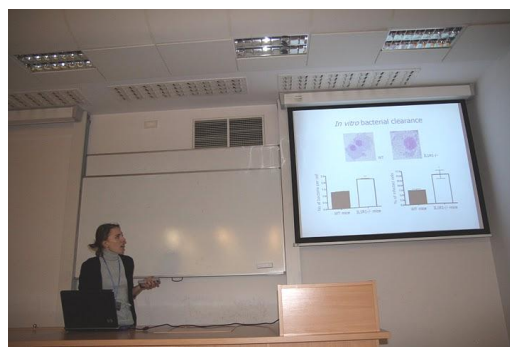
Fot. 5 Uczestnicy I Rajdu Biotechnologa (fot. Krzysztof Krawczyk)

Łukasz Skalniak

DRUGA NIEMIECKO-POLSKA KONFERENCJA NAUKOWA „GERMAN/POLISH LIFESCIENCE MEETING” KRAKÓW, MARZEC 2009

W dniach 24 – 28 marca 2009 na terenie III Kampusu 600 lecia Odnowienia Uniwersytetu Jagiellońskiego odbyła się druga edycja niemiecko-polskiej studenckiej konferencji naukowej GPLSM. W konferencji tej, dotyczącej zagadnień biologii molekularnej, wzięli udział studenci trzech uczelni wyższych: Technicznego Uniwersytetu w Monachium, Akademii Medycznej w Poznaniu oraz Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Głównym celem przyświecającym organizatorom konferencji było umożliwienie młodym, początkującym naukowcom - studentom studiów magisterskich, nabrania doświadczenia w prezentacji wyników naukowych oraz podejmowania światłej dyskusji celem obrony własnego punktu widzenia lub poznania opinii innych uczestników debat naukowych.

Podczas pięciu dni trwania konferencji każdy z jej uczestników miał okazję wygłoszenia swego wystąpienia w języku angielskim. Najlepsze prezentacje, wybrane przez uczestników Konferencji, zostały wyróżnione, a jej autorom przekazane zostały nagrody rzeczowe w postaci książek „Medical Biotechnology” wydawnictwa Elsevier oraz akcesoriów komputerowych. Poziom oraz gorliwość dyskusji naukowych, jakie nawiązywały się po każdym wystąpieniu, przerosła oczekiwania organizatorów spotkania. Dyskusje te świadczą niewątpliwie o wysokim zainteresowaniu młodych, rozpoczynających swą karierę naukowców problemami natury naukowej oraz potrzebie dyskusji z rówieśnikami, spoglądającymi nierzadko na te problemy z innej perspektywy. Niewątpliwym wzbogaceniem programu naukowego konferencji stały się wykłady zaproszonych gości w osobie dr hab. Alicji Józkowicz oraz dr hab. Jerzego Dobruckiego,



Fot 1. Podczas prelekcji

którzy przybliżyli uczestnikom konferencji odpowiednio sposoby wykorzystania wektorów wirusowych w terapii genowej oraz poprawy jakości obrazów mikroskopii fluorescencyjnej z wykorzystaniem metod dekonwolucji.

Drugim bardzo ważnym elementem organizacji imprezy było zapoznanie uczestników Konferencji z lokalną kulturą oraz historią miasta Krakowa poprzez organizację zwiedzania centrum miasta, wraz z jego najlepiej rozpoznawanymi obiektami: Wawelem, Katedrą Wawelską, Kościołem Mariackim oraz Sukiennicami. W trakcie zwiedzania uczestnicy skorzystali z usług wykwalifikowanego przewodnika anglojęzycznego. Uzupełnieniem poznawania uroków Krakowa stały się wspólne wieczory integracyjne, rozpoczynane kolacją konsumowaną w krakowskich restauracjach i kontynuowane aż do późnego wieczora na delectowaniu się niepowtarzalną akademicką atmosferą nocnego centrum miasta.

Połączenie wartości naukowych oraz kulturalno-rozrywkowych, jakich zorganizowana Konferencja GPLSM niewątpliwie dostarczyła uczestnikom, sprawiło, że w oczach zarówno uczestników, jak i organizatorów impreza ta okazała się być niezwykle udana. Waga Konferencji GPLSM wzrasta tym bardziej, że obecnie niewiele jest tego typu spotkań, w których to młodzi naukowcy są w centrum uwagi i mają możliwość zabrania głosu i prezentacji swoich pierwszych wyników pracy naukowej w



Fot. 2 Uczestnicy konferencji

języku angielskim. Bardzo często zdarza się ponadto, że wysokie koszty uniemożliwiają uczestnictwo w konferencjach młodym naukowcom. Dlatego też, w przypadku konferencji GPLSM organizatorzy dołożyli wszelkich starań, aby udział w niej był bezpłatny. Dzięki zaangażowaniu sponsorów udało się pokryć wszelkie koszty związane m.in. z transportem, noclegami czy wyżywieniem uczestników, co w znacznym stopniu zrównało szanse uczestnictwa każdego studenta zainteresowanego tematyką biologii molekularnej.

Zainteresowanie inicjatywami typu GPLSM oraz rzetelność przygotowania wystąpień naukowych świadczą o potrzebie organizacji studenckich spotkań naukowych. Spotkania te są niepowtarzalną okazją na zdobycie nowych doświadczeń oraz nawiązanie kontaktów naukowo-towarzyskich, co niewątpliwie może zaowocować podniesieniem jakości wystąpień i kwalifikacji przyszłych pracowników naukowych. Ufamy, że idea organizacji konferencji GPLSM nie przeminie, lecz będzie kontynuowana i rozwijana w kolejnych latach i w kolejnych edycjach.

Organizatorzy drugiej edycji GPLSM

Łukasz Skalniak

Michał Rysz

Łukasz Skalniak

NAUKA CZY FIKCJA? OSZUSTWA W NAUCE

„Jestem głęboko przekonany, że rozwój nauki służy przede wszystkim zaspokojeniu tęsknoty za czystą wiedzą.”

[Albert Einstein]

Ciekawość od wieków jest siłą sprawczą postępu. W świecie zwierząt jest ona motorem zachowań eksploracyjnych, które przekładają się na zbiór doświadczeń zwiększających szansę na przetrwanie. Ciekawość towarzysząca człowiekowi dała natomiast także początek rozwojowi Nauki. Nauki czystej, bezinteresownej. Nauki, która „prowadzi nas do zrozumienia tego, jaki jest świat, a nie tego, jaki chcielibyśmy, by był” [Carl Sagan]. Czy ten pierwotny obraz nauki wciąż pozostaje aktualny?

W czerwcu 2005 roku świat obiegła informacja, która miała zmienić oblicze medycyny. Znany koreański genetyk, jeden z pionierów klonowania somatycznego ogłosił na łamach czasopisma Science wyprowadzenie 11 linii komórek macierzystych dostosowanych genetycznie do pacjentów, z których pobrano materiał do ich uzyskania. Jak nietrudno sobie wyobrazić prasa szybko podchwyciła temat i zapanowało ogólne przekonanie, że oto stoimy u progu ery, w której schorzenia takie jak cukrzyca czy choroba Parkinsona odejdą w zapomnienie za sprawą terapii z zastosowaniem komórek macierzystych. Koreański profesor niesiony na skrzydłach opublikowanego wysoko sukcesu szybko otworzył pierwszy na świecie bank komórek macierzystych. Sukces ten nie potrwał jednak nawet do końca roku. W grudniu 2005 za sprawą jednego z bliskich współpracowników profesora wyszło na jaw, że 9 spośród 11 linii nigdy nawet nie istniało. Co więcej wkrótce autentyczność także i dwóch pozostałych linii została podważona, gdyż linie te nie wykazywały cech komórek macierzystych i szybko obumarły. Okryty niedawno sławą profesor, potępiony teraz przez środowisko naukowe i opinię publiczną stanął przed komisją rządową, która stwierdziła jednoznacznie, że nie może być mowy o technicznej omyłce, lecz wszystko wskazuje na to, że wyniki badań zostały „rozmyślnie sfabrykowane”. Profesor wkrótce przyznał się do zarzucanego mu czynu. Artykuł w Science został wycofany, podobnie jak wcześniejszy artykuł tego autora.

Historia wydaje się być nieprawdopodobna. Jak mogło dojść do tak dużego oszustwa? Natychmiast nasuwają się kolejne pytania: czy jest to przypadek

odosobniony? Jak częste w środowisku naukowym jest fabrykowanie wyników i czy obecny system oceny wyników badań wysyłanych do publikacji dobrze radzi sobie z ich weryfikacją? Czy informacje opublikowane są informacjami pewnymi?

Niestety, przykładów spektakularnych oszustw odnotowano znacznie więcej. Wspomnieć można choćby przypadek norweskiego doktora, który w prestiżowym czasopiśmie *Lancet* dowodził, że zażywanie leków przeciwzapalnych podwyższa ryzyko zapadnięcia na nowotwór wargi, jednocześnie zmniejszając ryzyko chorób układu krążenia. Badania przeprowadzone zostały na 908 pacjentach, z których... żaden nie istniał w rzeczywistości. Skrzątnie uknuta mistyfikacja wyszła na jaw tylko dlatego, że dla 250 „pacjentów” naukowiec wymyślił tę samą datę urodzin.

W 2001 roku niemiecki fizyk ogłosił na łamach *Nature*, że skonstruował organiczny tranzystor w skali molekularnej. Byłby to prawdziwy krok milowy ku elektronice organicznej i komputerom o potężnej mocy obliczeniowej. W 2001 roku fizyk ten był indeksowany jako współautor jednej pracy tygodniowo. W swej działalności naukowej był on jednak na tyle „niedbały”, że wykorzystał ten sam zestaw danych jako wynik kilku różnych eksperymentów publikowanych w różnych czasopismach. W toku postępowania okazało się, że wiele danych opublikowanych w *Nature* oraz innych periodykach naukowych były całkowicie zmyślane. W rezultacie z samego tylko *Nature* oraz *Science* wycofanych zostało aż 15 artykułów nieuczciwego naukowca.

Znacznie wcześniej, w 1912 roku, pewien Brytyjczyk zaprezentował światowi naukowemu czaszkę współczesnego człowieka z dostawioną zuchwą orangutana i przedstawił jako pozostałość po pracźlowieku zamieszkującym niegdyś tereny Anglii. Niedługo później odnaleziono w Afryce prawdziwe szczątki naszych przodków, jednak jeszcze do połowy XX wieku wielu ludziom łatwiej było uwierzyć w angielskiego człowieka z Piltown, jak nazwano to oszukańcze odkrycie, niż w afrykańskie korzenie ludzkiej cywilizacji.

Przykłady te mogą wydawać się szokujące, bulwersujące, czasem może nieco zabawne. Ale jeśli się nad tym głębiej zastanowić, przede wszystkim wydają się bardzo odległe, jak odległe wydają się nieszczęścia gdy dotyczą odległych nam zakątków świata. W rzeczywistości jednak rozmiary problemu publikowania sfabrykowanych wyników badań są zdecydowanie większe niż nam się to wydaje, a jednocześnie trudne lub nawet niemożliwe do oszacowania.

ORI, jedna z amerykańskich agencji rządowych przeprowadziła analizę, w której poprosiła ponad 2200 naukowców o zgłaszanie (bez ponoszenia konsekwencji) oszustw

naukowych, zaobserwowanych w ich najbliższym otoczeniu. Wyniki tej analizy, opublikowane w 2008 roku w *Nature* wskazują, że każdego roku co najmniej 3% naukowców dopuszcza się fałszowania swoich wyników. Autorzy sugerują, że w związku z wieloma ograniczeniami stosowanej przez nich metody dane te mogą być znacznie zaniżone.

Wśród najczęściej wymienianych, zauważonych oszustw znalazły się takie manipulacje danymi, jak:

- „podrasowywanie” wyników, czyli zmiana uzyskanych wartości tak, aby otrzymać mniejsze odchylenia, wyniki bardziej istotne statystycznie.
- zmyślanie danych
- przedstawianie zestawu danych jako wyniku różnych eksperymentów (np. opisywanie immunoblotów w sposób niezgodny z prawdą)
- bezpodstawne odrzucanie wyników, które nie pasują lub odbiegają od reszty
- niedozwolona manipulacja zdjęć (mikroskopowych, blotów itp.) z użyciem oprogramowania graficznego.

Niestety nie sposób jest ocenić w jak wielu opublikowanych pracach dopuszczono się choćby jednego z fałszerstw. Dlatego należy zawsze mieć oczy otwarte i krytycznie spoglądać na to, co czytamy w publikacjach. Nie chodzi oczywiście o to, by podważać każdy wynik. Idealnie jest jednak podierać się zawsze doniesieniami kilku niezależnych grup naukowych i drążyć temat, bo pomimo, że pojedyncze doniesienia mogą zawierać błędne dane, często, zgodnie z zasadą samooczyszczania się nauki, ogólny wizerunek zagadnienia jest poprawny i, miejmy nadzieję, zintegrowanie wyników dostarczonych przez różne źródła pozwala nam zmierzać do poznania prawdy.

Co stało się zatem z Nauką czystą i bezinteresowną? Dlaczego coraz częściej odchodzi ona od dawnych ideałów? Niestety w dzisiejszych czasach zaspokajanie tęsknoty za czystą wiedzą nie jest już siłą napędową pracy naukowej. Zastąpiona została ona innymi pragnieniami: pragnieniem sławy, kariery, ciągłości finansowej. Siłą napędową dzisiejszej nauki przedstawić można jako samonapędzające się koło. Naukowiec dostaje kredyt zaufania: grant, pieniądze na badania, które jednak ostatecznie trzeba rozliczyć. Najlepszą kartą przetargową w rozliczeniu grantu są publikacje, a dobre rozliczenie grantu i dobre publikacje są gwarancją otrzymania kolejnego kredytu zaufania w postaci dalszych dotacji. Zasadniczo im wyżej wyniki są publikowane, tym większa szansa na środki finansowe. W zdrowym świecie, jak w firmie, taki system motywacyjny sprawiałby, że jakość publikowanych wyników byłaby coraz wyższa tak, aby sprostać restrykcyjnym kryteriom przyjmowania publikacji przez renomowane

czasopisma. Człowiek jednak lubi chodzić na skróty i czasem woli z premedytacją przymknąć oko na to, pod czym się podpisuje, niż utracić szansę na odniesienie sukcesu.

Analizy oszustw naukowych wskazują, że jedną z podstawowych przyczyn, dla których naukowcy decydują się publikować wątpliwe lub zmyślane dane jest przekonanie, że teoria przez nich wymyślona jest teorią prawdziwą. W związku z tym fabrykowane wyniki w ich oczach są wynikami, jakie, jak sami wierzą, otrzymali by, gdyby faktycznie przeprowadzili opisywany eksperyment. Pokora i zdystansowanie się do subiektywnych opinii coraz częściej przegrywają z zuchwałością. Zjawisko to potęgowane jest dodatkowo przez najróżniejsze presje: presję terminu, zwierzchnika czy systemu. Wszystko to prowadzi do degradacji autorytetu nauki.

To my, Czytelniku, tworzymy naukę. Nawet jeśli jeszcze nie teraz, w przyszłości w naszych rękach znajdzie się odpowiedzialność za to jaka ona będzie. Czy będzie ona nauką rzetelną? Czy może będzie tylko narzędziem do pozyskania innych celów: sławy, tytułów, pieniędzy na dalsze badania? Czasem powody dla których ludzie decydują się na oszustwo są dużo bardziej błahe: bo chcę mieć ładną pracę magisterską, bo i tak kończymy z tym tematem, bo trzeba rozliczyć grant, bo i tak nikt na świecie tego nie sprawdzi, bo chcę pokazać, że jednak coś potrafię, bo szef lubi ładne wyniki... Niestety wielu z nas prawdopodobnie prędzej czy później stanie w obliczu konieczności dokonania wyboru – czy ulec pokusie, czy pozostać wiernym niepisanemu kodeksowi naukowca?

„Wiedza daje pokorę wielkiemu, dziwi przeciętnego, nadyma małego”

[Lew Tołstoj].

Wielkości – tego życzę Tobie, Czytelniku.

WYKORZYSTANIE MACIERZY PSSM W POSZUKIWANIU SEKWENCJI ODPOWIADAJĄCYCH NA WĘGLOWODANY (CHRE)

Streszczenie

Organizmy w czasie ewolucji wykształciły wiele mechanizmów pozwalających reagować na zmienne warunki środowiskowe. Jednym z najważniejszych elementów jest przestawienie organizmu z jednego pokarmu na inny, np. w czasie głodu cukrowego organizm zmienia metabolizm i korzysta z tkanki tłuszczowej. Przystosowanie takie jest uzasadnione z ewolucyjnego punktu widzenia, gdyż w ten sposób organizm nie marnuje energii na wytwarzanie zbędnych enzymów. Najważniejszym składnikiem odżywczym jest glukoza. Organizmy musiały więc wykształcić złożone mechanizmy do reagowania na zmiany jej stężenia. W promotorach genów związanych z metabolizmem cukrów, (np. glikoliza czy lipogeneza), można odnaleźć charakterystyczną sekwencję złożoną z dwóch motywów E-box odseparowanych od siebie pięcioma dowolnymi nukleotydami tzw. element odpowiadający na węglowodany (ChRE). Taka sekwencja nukleotydowa wiąże dwa czynniki transkrypcyjne: białko wiążące element odpowiadający na węglowodany (ChREBP) oraz jako negatywny modulator, białko X podobne do białka Max (Mlx). Całość tworzy ścieżkę reagującą na glukozę bez udziału insuliny.

Celem tej pracy było napisanie programu, który umożliwiałby poszukiwanie sekwencji ChRE w promotorach różnych genów. Jako przykładowe wybrano promotory trzech genów: fruktokinazy, receptora interleukiny 6 oraz czynnika wzrostu fibroblastów 21. Geny te wybrano, gdyż są one prawdopodobnie stymulowane przez glukozę (na podstawie [8]). Aby osiągnąć wyznaczony cel, z loga sekwencyjnego ChRE przygotowano pozycyjnie zróżnicowaną macierz wartościującą (PSSM). Po uzyskaniu macierzy, pobrano promotory wyżej wymienionych genów z nukleotydowej bazy danych. Następnie napisano program, który jako dane wejściowe pobierał macierz PSSM oraz sekwencję nukleotydową i szukał w niej sekwencji ChRE. Tym sposobem wykryto w promotorze genu fruktokinazy kilka sekwencji, które potencjalnie mogą wiązać ChREBP.

1. Wstęp

Regulacja ekspresji genów regulowana przez składniki pożywienia jest ważnym przystosowaniem umożliwiającym przetrwanie przy nieregularnym dostarczaniu składników odżywczych. Przystosowanie to istnieje u większości organizmów od drożdży do ssaków. Przykładem mechanizmów regulatorowych, wykształconych przez organizmy aby poradzić sobie z ze zmianami ilości składników odżywczych, jest odpowiedź na glukozę [16]. U ssaków odpowiedź ta jest bardzo złożona. W komórkach beta trzustki glukoza jest nadrzędnym regulatorem syntezy i wydzielania insuliny. W wątrobie, (która jest głównym narządem umożliwiającym przekształcanie nadmiarowych składników pożywienia, np. cukrów w triglicerydy), w obecności insuliny, indukuje ekspresję genów kodujących transportery glukozy oraz enzymy uczestniczące w gliko- i lipogenezie np. kinazę pirogronianową (L-PK), karboksylazę acetylo-CoA (ACC) i syntazę kwasów tłuszczowych oraz hamuje syntezę enzymów uczestniczących w glukoneogenezie. Wykazano, że insulina (jak również glukagon), nie jest niezbędna. Same składniki pożywienia odgrywają ważną rolę w transkrypcji genów niezależnie od tych hormonów, np. ekspresja genu L-PK jest, w kulturach hepatocytów wykazujących ekspresję glukokinazy, stymulowana przez glukozę pod nieobecność insuliny.

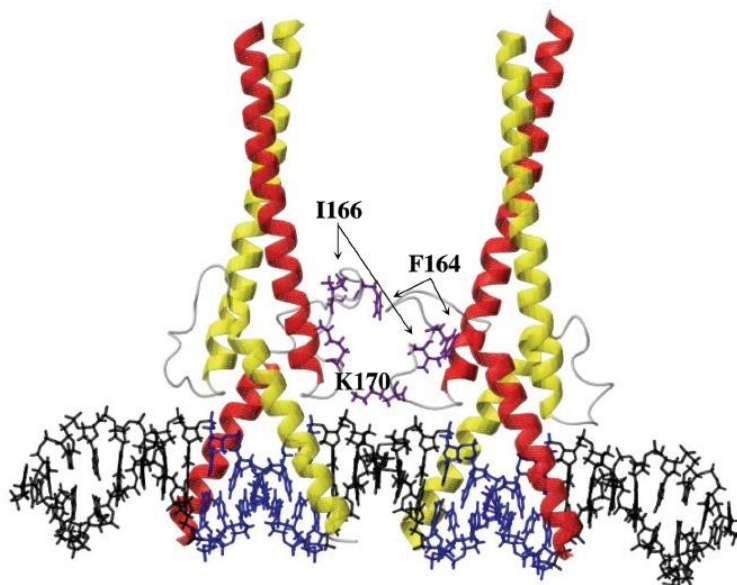
Mechanizm, za pomocą którego nadmiar składników odżywczych generuje sygnał indukujący transkrypcję genów lipogenezy, nie jest do końca znany. Badania wykazały, że wiele spośród tych genów posiada wewnątrz promotorów sekwencje ChRE (ang. *carbohydrate responsive element*, element odpowiadający na węglowodany), który umożliwia bezpośrednią odpowiedź na glukozę. Sekwencje te zostały użyte do scharakteryzowania białek, które pośredniczą w odpowiedzi na zwiększone stężenie cukrów.

1.1. Element odpowiadający na węglowodany

Element odpowiadający na węglowodany jest elementem cis-regulacjonowym promotorów genów indukowanych przez glukozę [9]. Sekwencje DNA, które odpowiadają za wiązanie czynnika transkrypcyjnego w odpowiedzi na glukozę zidentyfikowano i dokładnie opisano w kilku genach m.in. w L-PK, ACC i S14. Składa się ona z dwóch motywów E-box (CACGTG) odseparowanych od siebie pięcioma dowolnymi nukleotydami [1, 10, 11, 13, 15,]. Odstęp ten wydaje się być ważnym elementem [13]. Mutacja powodująca wstawienie szóstego nukleotydu oddzielającego silnie zaburza odpowiedź na glukozę [6], natomiast delecja nukleotydu powoduje

delecją obydwu alleli ChREBP nie tolerują glukozy, są odporne na insulinę oraz mają zmniejszony poziom glikolizy i lipogenezy [5].

W hepatocytach poziom ChREBP jest regulowany przez fosforylację/defosforylację tego białka [7]. Przy niskich stężeniach glukozy ChREBP występuje w nieaktywnej, fosforylowanej formie w cytozolu. Ten czynnik transkrypcyjny posiada dwa główne miejsca fosforylacji dla kinazy A: pierwsze blisko miejsca sygnalizacji jądrowej (Ser196) oraz drugie blisko miejsca wiążącego DNA (Thr666). Defosforylacja Ser196 skutkuje przemieszczeniem ChREBP z cytoplazmy do jądra komórkowego, podczas gdy defosforylacja Thr666 umożliwia mu wiązanie DNA. Istnieją jednak badania [3], które zmieniają nieco ten obraz i kwestionują niektóre poglądy na temat fosforylacji i defosforylacji ChREBP, np. pokazują, że nie tylko wysokie stężenie glukozy powoduje przemieszczenie się białka do jądra, ale także niskie. Kinaza aktywowana AMP (AMPK) także reguluje ChREBP. Fosforyluje ona Ser568,



Rysunek 1.2 Model regionu bHLH/LZ dwóch heterodimerów ChREBP-Mlx wiążących ChRE. Rysunek pochodzi z pracy „A critical role for the loop region of the basic helix-loop-helix/leucine zipper protein Mlx in DNA binding and glucose-regulated transcription” Ma et al. [9]. Autorzy wygenerowali go używając techniki minimalizacji energii oraz dynamiki molekularnej na strukturach uzyskanych z modelowania homologicznego. Helikalne regiony Mlx oraz ChREBP są oznaczone odpowiednio na czerwono i żółto, natomiast sekwencje E-box i sekwencje flankujące odpowiednio na niebiesko i czarno. Reszty aminokwasowe istotne dla wiązania się ChREBP zostały oznaczone na fioletowo: F164, I166 oraz K170

co powoduje zmniejszenie zdolności do wiązania DNA [2].

Białko X podobne do Max (ang. *Max-like protein X*, Mlx) jest funkcjonalnym partnerem ChREBP w regulowaniu glukozy-zależnych genów w hepatocytach [14]. Oba te białka są potrzebne do pełnej odpowiedzi na glukozę (Rysunek 1.2). Dominująca w wątrobie forma negatywna Mlx powoduje zahamowanie odpowiedzi na glukozę dużej liczby genów związanych z lipogenezą, włączając w to PK, ACC, S14 oraz FAS [8]. Zahamowanie to jest odwracane przez nadekspresję ChREBP (powstaje wtedy więcej dimerów ChREBP*ChREBP, które indukują ekspresję genów).

2. Materiały i metody

2.1. Pozycyjnie zróżnicowana macierz wartościująca

Głównym celem pracy było przeszukanie sekwencji promotorowych kilku dowolnych genów w celu określenia czy mogą one być regulowane przez glukozę. Bardzo dobrym sposobem przeszukiwania sekwencji, w celu odnalezienia miejsca wiązania jakiegoś czynnika transkrypcyjnego, jest wykorzystanie pozycyjnie zróżnicowanej macierzy wartościującej (ang. *position specific scoring matrix*, PSSM). Macierz taka składa się z czterech wierszy reprezentujących cztery nukleotydy (A, C, T, G) oraz dowolnej ilości kolumn reprezentujących kolejne miejsca sekwencji. Każde miejsce opisane jest prawdopodobieństwem wystąpienia danego nukleotydu na konkretnej pozycji w motywie (z czego wynika, że wartości w poszczególnych kolumnach muszą sumować się do jedności). Przykładową macierz PSSM przedstawia tabela 2.1.

	1	2	3	4	5
A	0.50	0.00	0.25	0.50	0.75
C	0.25	0.00	0.25	0.00	0.00
T	0.25	0.00	0.25	0.00	0.25
G	0.00	1.00	0.25	0.50	0.00

Tabela 2.1 Przykładowa macierz PSSM. Przyglądając się jej można zauważyć, że na pozycji drugiej możliwy jest tylko jeden nukleotyd (G), na pozycji trzeciej może wystąpić dowolny, natomiast na czwartej możliwa jest tylko puryna (A lub G)

2.2. Generowanie macierzy PSSM dla ChRE

Aby wygenerować pozycyjnie zróżnicowaną macierz wartościującą dla ChRE wykorzystano logo sekwencyjne ChRE umieszczone w pracy Ma, Sham, Walters, and Towle [9]. Logo skopiowano do programu służącego do edycji grafiki Gimp i zmierzono (w pikselach) wysokości poszczególnych stosów oraz nukleotydów. Wartości uzyskane znormalizowano (tak aby suma w kolumnie wynosiła 1) i umieszczono w pliku chre.pfm. Macierz musi być ułożona zgodnie ze wzorem: w kolejnych wierszach umieszczone są prawdopodobieństwa nukleotydów kolejno A, C, T, G. W innym przypadku wynik nie będzie odpowiadał prawdzie.

2.3. Program MatrixSearch

W języku Python napisano program MatrixSearch, który pobiera macierz PSSM z pliku o rozszerzeniu *.pfm i poszukuje w zadanej sekwencji motywu wiążącego czynnik.

2.3.1 Wczytanie macierzy i jej obróbka wewnątrz programu

Używanie surowej macierzy bezpośrednio po wczytaniu jest niewygodne, gdyż prawdopodobieństwa na poszczególnych pozycjach się nie dodają lecz mnożą. Wynika to stąd, że na każdej pozycji w sekwencji nukleotydy występują niezależnie od siebie. Co więcej, wynik musi być przedstawiony w zrozumiałej postaci, tzn. trzeba ustalić sposób punktacji pozycji. Te dwa zadania można zrealizować jednocześnie.

2.3.2. Przeszukiwanie sekwencji i zwracany wynik

Program ustala tzw. okno przeszukiwania. Jest to krótki odcinek nukleotydowy, ustalany na podstawie długości sekwencji konsensusowej, pobierany z sekwencji głównej. Po pobraniu okna program sprawdza każdy kolejny nukleotyd w oknie i porównuje do konkretnej pozycji macierzy. Wynik częściowy zapisuje, a następnie sumuje rezultat. Program sprawdza także ilość wystąpień nukleotydów różnych od sekwencji konsensusowej. Następnie zapisuje pozycję końcową i początkową okna (względem początku sekwencji), sekwencję okna, rezultat punktowy oraz liczbę różniących go nukleotydów od konsensusu i zapisuje wszystko do pliku. Na końcu okno jest przesuwane o jeden nukleotyd dalej i cały cykl się powtarza.

2.4. Promotory użyte do przeszukiwania

Z pracy „A critical role for the loop region of the basic helix-loop-helix/leucine zipper protein Mlx in DNA binding and glucose-regulated transcription” Ma et al. [9] wybrano trzy następujące geny indukowane przez glukozę i hamowane przez Mlx: receptor interleukiny 6 (IL-6R), czynnik wzrostu fibroblastów 21 (FGF-21) oraz fruktokinazę. Na stronie NCBI odszukano sekwencje szczurze (gdyż logo sekwencyjne zostało złożone w większości z sekwencji ChRE pochodzących ze szczura) tych genów i wycięto z nich promotory o długości 10 kpz. Następnie przeszukano promotory za pomocą programu MatrixSearch.

3. Wyniki i dyskusja

Po przeszukaniu sekwencji ustalono, że tylko promotor fruktokinazy posiada sekwencje w pełni zgodne z sekwencją konsensusową ChRE. Wynik taki był do przewidzenia, gdyż fruktokinaza jest enzymem uczestniczącym w glikolizie, przez co jest pożądane, aby była regulowana przez cukry. Najlepszy wynik punktowy uzyskany w tym promotorze to 10,98 dla sekwencji GGCGAGGCTGAGCCGTG. Najwyższy wynik możliwy do uzyskania to 17,5, a najmniejszy to -3300. Można więc powiedzieć, że sekwencja ta będzie wiązała ChREBP z prawdopodobieństwem większym niż 50% względem sekwencji o najlepszych parametrach. Oczywiście potwierdzić taki scenariusz można jedynie poprzez eksperymenty np. test EMSA.

Pozostałe dwa promotory (IL-6R oraz FGF-21) nie zawierają sekwencji w 100% zgodnych z sekwencją konsensusową. Najlepszy wynik punktowy dla FGF-21 to -318,15 dla sekwencji AGTGGGGAGGGCACGTG. Różni się ona od konsensusowej pierwszym nukleotydem (puryna zamiast pirymidyny). Zmiana taka może mieć znaczący wpływ na wiązanie czynnika transkrypcyjnego. Tak jak w poprzednim przypadku, ostateczna weryfikacja może zostać potwierdzona tylko eksperymentalnie.

Dla receptora interleukiny 6 najlepszym wynikiem był -319,11 dla sekwencji GATAGGTTACAGGCGTG. Sekwencja ta od konsensusowej różni się nukleotydem czwartym (zamiast G posiada A). Znaczenie pozycji czwartej nie jest do końca wyjaśnione. Jak widać puryna została zastąpiona puryną, przez co efekt nie musi być aż tak drastyczny dla wiązania czynnika.

4. Podsumowanie

Metody bioinformatyczne nigdy nie zastąpią eksperymentu. Pozwalają jednak na ukierunkowanie badań, na wskazanie drogi jaką należy podążać.

Wyobraźmy sobie, że mamy promotor jakiegoś genu i wiemy, że odpowiada on na glukozę bez pośrednictwa insuliny. Chcemy ustalić, która część tego promotora odpowiada za tę właściwość (zakładamy, że znamy jego sekwencję nukleotydową). Możemy, np. pociąć go na kawałki, każdy z takich fragmentów wklonować do wektora z lucyferazą i sprawdzać, w którym ekspresja lucyferazy wzrosła po stymulacji glukozą. Możemy — mając do dyspozycji ChREBP — próbować uzyskać sekwencję odpowiadającą na glukozę za pomocą metody „odcisku stopy”. Możemy wreszcie skorzystać z dostępnej literatury, komputerów, Internetu i metod bioinformatycznych, a następnie zbudować, na podstawie innych znanych sekwencji, sekwencję konsensusową. Za jej pomocą możemy wybrać fragmenty do analizy i przeprowadzić eksperymenty, które z największym prawdopodobieństwem dadzą pozytywny wynik. Oszczędzając tym samym wiele cennego czasu.

5. Literatura

1. Bergot M O et al. Cis-regulation of the l-type pyruvate kinase gene promoter by glucose, insulin and cyclic AMP. *Nucleic Acids Res*, 20(8):1871–1877, April 1992.
2. Gabriela da Silva Xavier et al. ChREBP binding to fatty acid synthase and l-type pyruvate kinase genes is stimulated by glucose in pancreatic beta-cells. *J Lipid Res*, 47(11): 2482–2491, November 2006.
3. Davies M et al. Glucose activates ChREBP by increasing its rate of nuclear entry and relieving repression of its transcriptional activity. *J Biol Chem*, 283(35):24029–24038, August 2008.
4. de Luis O et al. WBSCR14, a putative transcription fac-tor gene deleted in Williams-Beuren syndrome: complete characterisation of the hu-man gene and the mouse ortholog. *Eur J Hum Genet*, 8(3):215–222, March 2000.
5. Iizuka K et al. Defi-ciency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19):7281–7286, May 2004.
6. Koo S H et al. Glucose and insulin function through two di-stinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver. *J Biol Chem*, 276(12):9437–9445, March 2001.
7. Li M et al. Glucose-dependent transcriptional regulation by an evolutionarily conserved glucose-sensing module. *Diabetes*, 55(5):1179–1189, May 2006.
8. Ma L et al. ChREBP**MLx* is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem*, 28 (39):28721–28730, September 2006.
9. Ma L et al. A critical role for the lo-op region of the basic helix-loop-helix/leucine zipper protein *mlx* in DNA binding and glucose-regulated transcription. *Nucleic Acids Res*, 35(1):35–44, 2007.

10. O'Callaghan B L et al. Glucose regulation of the acetyl-CoA carboxylase promoter PI in rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 276(19):16033–16039, May 2001.
11. Rufo C et al. Identification of a novel enhancer sequence in the distal promoter of the rat fatty acid synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 261 (2):400–405, August 1999.
12. Schneider T D et al. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Research*, 18(20):6097–6100, October 1990.
13. Shih H M et al. Two CACGTG motifs with proper spacing dictate the carbohydrate regulation of hepatic gene transcription. *J Biol Chem*, 270(37):21991–21997, September 1995.
14. Stoeckman A et al. Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem*, 279(15): 15662–15669, April 2004.
15. Thompson K S et al. Localization of the carbohydrate response element of the rat l-type pyruvate kinase gene. *J Biol Chem*, 266(14):8679–8682, May 1991.
16. Vaulont S et al. Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem*, 275(41):31555–31558, October 2000.
17. Yamashita H et al. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(16):9116–9121, July 2001

ROLA WYBRANYCH GENÓW HOMEOTYCZNYCH I MORFOGENÓW W PROCESACH NEUROGENEZY I ROZWOJU SZKIELETU CZASZKOWEGO KRĘGOWCÓW NA PRZYKŁADZIE MYSZY.

1. Wstęp

Podczas rozwoju embrionalnego zachodzi wiele ważnych procesów, które uzupełniając się nawzajem odgrywają decydującą rolę w rozwoju embrionalnym ssaków. Procesami tymi kierują geny homeotyczne oraz morfogeny. Do grupy genów homeotycznych należą geny zwane *Hox*, bardzo konserwatywne ewolucyjnie, które są odpowiedzialne za kształtowanie się przednio-tylnej osi, jak również tożsamości poszczególnych segmentów podczas wczesnego rozwoju embrionalnego. Regulują one także ilość i ułożenie poszczególnych części ciała. Znanych jest ok. 40 genów *Hox*, zaliczanych do czterech grup – A, B, C, D, z których każda ma swoje locus na innym chromosomie [1].

Przestrzenno-czasowa aktywacja genów homeotycznych pokrywa się z kolejnością występowania na chromosomach. Oznacza to, że geny z każdego klasteru są włączane w kolejności przypisanych im numerów, czyli najpierw np. A1 a potem A2, A3 itd. oraz, że w takiej samej kolejności występują w embrionie idąc od głowy do ogona, czyli w części przedniej ekspresji ulegają tylko geny z najniższym numerem, a w tylnej już wszystkie [1]. Z tego powodu w części przedniej embrionu we wczesnym etapie rozwojowym można zaobserwować ekspresje głównie genu *Hoxa2*, natomiast w dalszych odcinkach dochodzą kolejne geny z pozostałych grup. Oprócz tej kolinearności charakterystyczne dla genów homeotycznych jest występowanie dwóch domen *hox* – pozytywnej i negatywnej. Pierwsza z nich obejmuje część głowową do pierwszego rombomeru włącznie, druga – pozostałą część embrionu.

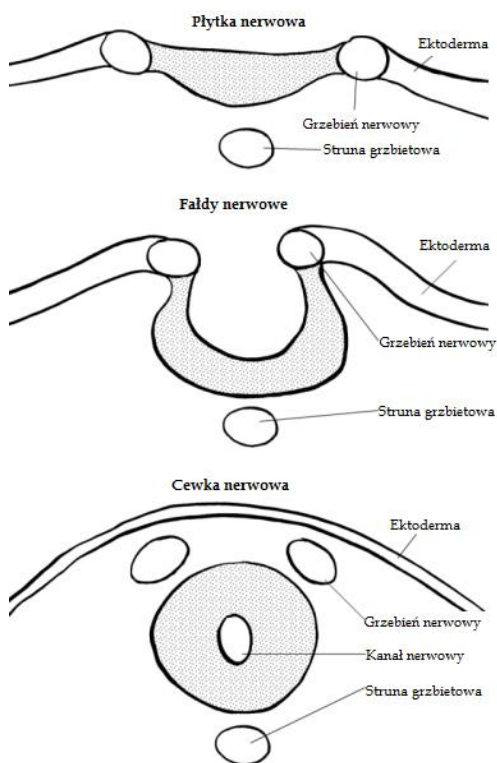
Ważnym czynnikiem regulującym rozwój embrionalny są morfogeny. Są to sygnały indukcyjne, których działanie wywołuje różne reakcje, zależnie od stężenia w jakim występują. Morfogen, który jest syntetyzowany na jednym końcu osi ciała, tworzy gradient stężenia wzdłuż jej przebiegu, w kierunku przeciwnego końca [1]. Często zdarza się również, że dwa morfogeny działają antagonistycznie do siebie. Występuje to wtedy, gdy są one syntetyzowane na przeciwległych końcach osi i stopniowo stężenie

każdego z nich maleje, podczas gdy drugiego rośnie. Substancje te często indukują lub utrzymują ekspresję poszczególnych genów. W przypadku stadium embrionalnego dotyczy to genów homeotycznych. Do grupy morfogenów możemy zaliczyć takie białka jak SHH (Sonic Hedge Hog), FGF8 (Fibroblast Groth Factor 8), WNT1 (Wingless integrated 1), białka z rodziny BMP (Bone Morphogenetic Protein) czy PAX (Paired Box) [2]. Wszystkie one w połączeniu z czynnikami kodowanymi przez geny homeotyczne kierują rozwojem poszczególnych grup komórek przez co ostatecznie kształtują nasz organizm.

2. Neurogeneza

2.1 Neurulacja

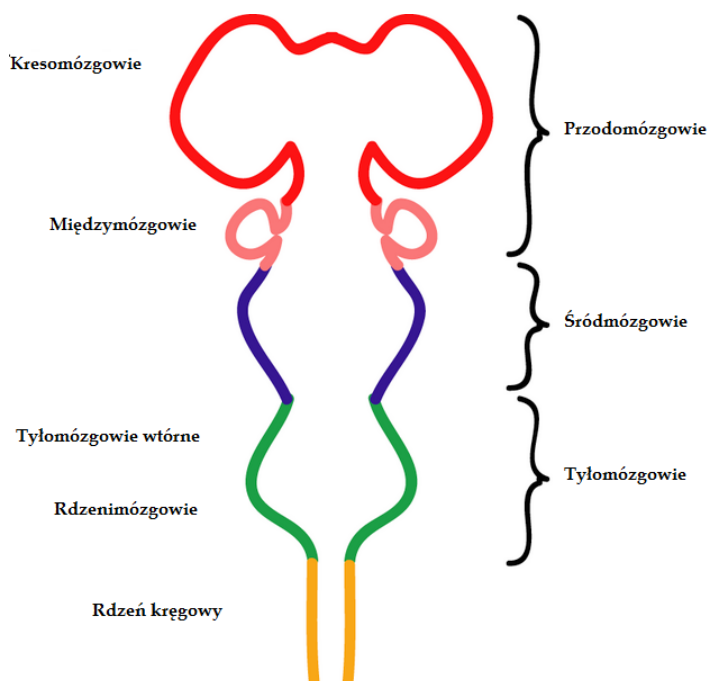
Pierwszym etapem neurogenezy jest neurulacja, czyli tworzenie cewy nerwowej. U kręgowców zaczyna się ona w momencie, gdy neuroektoderma, wyspecjalizowany obszar ektodermy, fałduje się wzdłuż centralnej osi i tworzy rynienkę nerwową ograniczoną przez dwa fałdy (Rys. 1). Następnym etapem jest fuzja powstałych fałdów w części grzbietowej, co prowadzi do powstania kanału nerwowego. U myszy powstaje jedno miejsce rozpoczęcia fuzji, zlokalizowane pośrodku embrionu, a następnie proces rozchodzi w przeciwnych kierunkach – w stronę głowy oraz ogona. Na poziomie fałdów tworzą się grzebienie nerwowe. Komórki znajdujące się w obrębie grzebieni (NCCs – ang. *neural crest cells*) są pluripotentne i migrując do części brzusznej dają początek nowym strukturom [1, 2]. Przednia część cewy nerwowej rozwija się w mózg, natomiast część tylna w rdzeń kręgowy. Początkowo mózg utworzony jest z trzech pęcherzyków pierwszorzędowych. Są nimi: przodomózgowie, śródmózgowie



Rysunek 1. Schemat obrazujący powstawanie cewki nerwowej [2].

oraz tyłomózgowie. Przodomózgowie różnicuje się na kresomózgowie i międzymózgowie, tyłomózgowie na tyłomózgowie wtórne oraz rdzeniomózgowie, natomiast śródmózgowie nie różnicuje się (Rys. 2). Podczas rozwoju kręgowców, oprócz podziału na poszczególne części mózgu, obserwuje się również podział całej cewy nerwowej na segmenty zwane neuromerami. Najłatwiejsze do rozpoznania są rombomery będące segmentami tyłomózgowia (Rhombencephalon). Każdy z nich jest niezależną, samodzielną grupą komórek. Właśnie w nich zachodzi ekspresja poszczególnych genów *Hox* odpowiedzialnych za segmentację ciała. Najciekawsze jest to, że granice między rombomerami (r) pokrywają się dokładnie z granicami domen ekspresji poszczególnych genów, czyli np. gen *Hoxa2* ulega ekspresji w r2 ale nie w r1 [1].

Oprócz zróżnicowania na mózg oraz rdzeń kręgowy wzdłuż osi przednio-tylnej, cała cewa nerwowa jest spolaryzowana grzbieto-brzusznie, co prowadzi do dodatkowego podziału funkcyjnego. Grzbietowa część daje początek nerwom czuciowym, natomiast brzuszna odpowiada za rozwój nerwów motorycznych. Polaryzacja jest również indukowana przez czynniki produkowane przez organy pierwotne powstające w okolicach cewy nerwowej.



Właśnie w płaszczyźnie grzbieto-brzusznej można zaobserwować gradient niektórych morfogenów, np. białko SHH kształtuje brzuszną część cewy i jest w dużej ilości produkowane przez strunę grzbietową oraz podstawę cewy nerwowej, a dopiero stamtąd na drodze dyfuzji przemieszcza się w kierunku grzbietowym. Górna część pozostaje natomiast pod wpływem czynników wzrostu takich jak BMP-4, BMP-7, WNT-1, czy WNT-3a

Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie mózgu w trakcie rozwoju embrionalnego. Po prawej pęcherzyki pierwotne, a po lewej rozwijające się z nich pęcherzyki wtórne [oparte o: <http://en.wikipedia.org/wiki/Prosencephalon>]

wydzielane przez ektodermę nad cewą. Czynniki uwalniane przez części grzbietową i brzuszna cewy działają przeciwstawnie do siebie [2].

Etap neurogenezy obejmujący tworzenie się cewy nerwowej jest jednym z krytycznych momentów w procesie rozwoju zarodka. Zaburzenia związane z neurulacją prowadzą do ciężkich upośledzeń lub śmierci jeszcze w życiu płodowym. Spowodowane mogą być one przez nieprawidłowy gradient cząsteczek sygnałowych otaczających węzeł zarodkowy lub upośledzony przekaz sygnałów za pomocą rzęsek. Dodatkowym czynnikiem mogą być również mutacje w genach odpowiedzialnych za fuzję fałdów nerwowych.

2.2 Organizacja mózgu

Początkowo mózg zbudowany jest z trzech pęcherzyków pierwotnych: przodomózgowia, śródmózgowia i tyłomózgowia. Na granicy pomiędzy śródmózgowiem i tyłomózgowiem znajduje się obszar zwany cieśnią. Jest to centrum organizacyjne, konieczne do prawidłowego rozwoju regionu śródmózgowia i tyłomózgowia, dla którego charakterystyczna jest ekspresja *Fgf8* oraz *Wnt1* [3] (Rys. 3A, B). Cząsteczki te są kluczowe w regulacji prawidłowej ekspresji genów odpowiedzialnych za utrzymanie granic między poszczególnymi regionami płytki nerwowej, z których następnie rozwijają się pęcherzyki pierwotne mózgu oraz rdzeń kręgowy [4]. Granicą ekspresji między tymi genami jest właśnie cieśń – *Wnt1* jest aktywny po stronie śródmózgowia, a *Fgf8* tyłomózgowia. Natomiast cząsteczki będące produktami tych genów dyfundują na drugą stronę cieśni, przez co każda z nich odgrywa rolę po obydwu stronach organizatora. Cieśń wykazuje również aktywność organizacyjną względem mózdzku oraz pokrywy mózgu [5]. Jej grzbietowa część jest zaangażowana w formowanie prawidłowego wzoru ekspresji grzbieto-brzuszej w cewie nerwowej [6].

2.2.1 FGF8 jako jeden z najważniejszych czynników organizacyjnych mózgu.

Wspomniany wcześniej FGF8 jest cząsteczką sekrecyjną, która reguluje ekspresję, przeżycie oraz proliferację komórek w śródmózgowiu i rombomerze 1 tyłomózgowia, jak również w rozwijających się kończynach i innych narządach. FGF8 wywiera duży wpływ na komórki mezenchymalne pochodzące z grzebieni nerwowych, przeznaczone do tworzenia struktur szkieletu twarzowego. Chirurgiczne usunięcie regionu zawierającego te komórki prowadzi do niedorozwoju szkieletu twarzowego oraz zahamowania zamknięcia się cewy nerwowej w rejonie przodomózgowia. Równocześnie

ekspresja *Fgf8* w kresomózgowiu jest zatrzymana. FGF8 wywiera dodatni wpływ na proliferację NCC, a w obszarze pierwszego łuku skrzelowego jest odpowiedzialny za ich rozwój w żuchwę. Dodatkowo, sama aktywacja *Fgf8* zależna jest od sygnału pochodzącego od NCC, co wskazuje na ścisłą zależność między FGF8 i NCC w rozwoju przodomózgowia oraz struktur szkieletu twarzowego, gdzie FGF8 uważany jest za jeden z najważniejszych lub nawet najważniejszy czynnik kontrolujący [7]. Dodatkowo, jedną z jego najistotniejszych funkcji we wczesnym stadium embrionalnym jest utrzymanie ekspresji *Wnt1* w obszarze cieśni, dzięki czemu mózg rozwija się prawidłowo. Aktywność FGF8 nie wystarcza jednak aby doszło do indukcji ekspresji *Wnt1* [4].

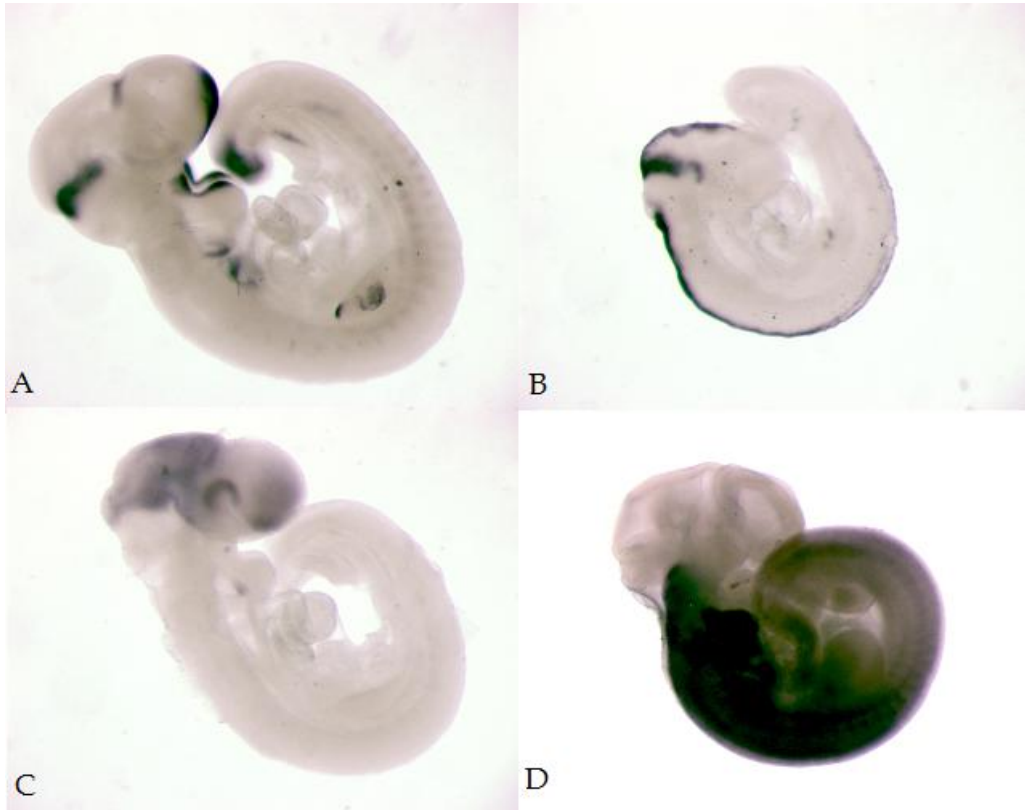
2.2.2 WNT1 jako bliski sąsiad FGF8.

WNT1 jest sekrecyjną glikoproteiną ulegającą ekspresji w tylnej części śródmózgowia. Transdukcja sygnału przekazywanego przez tę cząsteczkę zależy od β -kateniny. NT1 reguluje proliferację specyficznych populacji komórek prekursorowych w rozwijającym się regionie śród/tyłomózgowia i jest wtórnie zaangażowany w utrzymanie cieśni [8]. U myszy ze zmutowanymi allelami *Wnt1* brakuje większości śródmózgowia oraz sąsiadującej z nim części tyłomózgowia wtórnego [9]. Być może jest to spowodowane tym, że *Wnt* jest konieczny do podtrzymania ekspresji *Fgf8*, gdyż u myszy *Wnt1*^{-/-} już we wczesnym stadium zauważono zahamowanie ekspresji tego genu [4]. Dodatkowo *Wnt* jest jednym z czynników regulujących szlaki działania niektórych genów, m.in. *Otx2*, prowadzące do aktywacji śródmózgowych progenitorów dopaminergicznych, jak również do końcowego różnicowania śródmózgowych neuronów dopaminergicznych w późniejszych etapach embriogenezy [10].

2.2.3 OTX2 – czynnik transkrypcyjny współdziałający z morfogenami.

OTX2 (Orthodenticle Homeobox 2) jako czynnik transkrypcyjny odgrywa bardzo ważną rolę w rozwoju mózgu oraz organów czuciowych u ludzi. Podobne białko u myszy jest niezbędne do prawidłowego formowania się przodomózgowia, co również częściowo łączy się z organami czuciowymi [11] (Rys. 3C). OTX2 jest głównym czynnikiem kontrolującym tożsamość, rozprzestrzenianie oraz przeznaczenie populacji neuronalnych komórek progenitorowych w brzusznej części śródmózgowia, przez co wpływa na rozwój kilku populacji neuronalnych w tym rejonie [12]. Jest konieczny w neuroektodermie zarówno przy specyfikacji granicy między przodo- i śródmózgowiem, jak również kieruje morfogenezą mózgu przez regulację właściwości powierzchniowych

komórek, kontrolując ekspresję genów białek adhezyjnych, np. R-kadheryny [13]. Wpływając pozytywnie na ekspresję *Wnt1* oraz blokując ekspresję *Fgf8* pomaga utrzymać prawidłowy wzór ekspresji na obszarze cieśni [4].



Rysunek 3. Ekspresja genów zobrażowana za pomocą *Wole mount In situ hybridization*.

Embriony mysie: A, B, C – 9,5 dpc, D – 10,5 dpc.

(A) Ekspresja *Fgf8* widoczna jest w obszarze cieśni oraz przyszłego szkieletu twarzowego, jak również w miejscu przyszłych kończyn dolnych i górnych, w rozwoju których bierze udział.

(B) Ekspresja *Wnt1* włączona jest w rejonie cieśni, śród- i przedomózgowia oraz w rdzeniu kręgowym, natomiast jest nieaktywna w tyłomózgowiu, za rozwój którego odpowiada FGF8.

(C) *Otx2* jako czynnik transkrypcyjny wpływający dodatnio na *Wnt1* oraz blokując na *Fgf8* ulega ekspresji przednich częściach mózgu do granicy wyznaczonej przez ekspresją *Wnt1*.

(D) *Hoxa2* w stadium embrionalnym 10,5 dpc ulega ekspresji praktycznie w całym organizmie, z wyjątkiem domeny Hox-negatywnej, czyli głowy. Tak samo jak w przypadku *Wnt1*, *Fgf8* i *Otx2* widoczna jest wyraźna granica ekspresji genu.

3. Migracja komórek grzebieni nerwowych a ekspresja genów *Hox*.

Komórki grzebieni nerwowych, które są zlokalizowane w regionie rombomerów, pod wpływem czynników dyfuzyjnych (m.in. morfogenów) migrują aby dać początek ważnym strukturom w rozwijającym się embrionie. Komórki te wykazują ekspresję genów z rodziny *Hox*. Występują dwa obszary zbudowane z NCC. W pierwszym ulokowane są komórki pochodzące z pierwszego oraz drugiego rombomeru, które podczas migracji do pierwszego łuku skrzelowego tracą zdolność ekspresji genów *Hox*, przez co nazywany jest obszarem *Hox*-negatywnym. Z nich właśnie formowany jest szkielet twarzowy. Druga grupa (*Hox*-pozytywna), składa się z komórek, które utrzymują ekspresję genów *Hox*, gdy ostatecznie docierają do pozostałych łuków skrzelowych. Są to komórki migrujące z rombomerów od czwartego do ósmego. Komórki z rombomeru trzeciego migrują do łuku skrzelowego pierwszego oraz drugiego, więc zachowują się odpowiednio jak *Hox*-negatywne lub *Hox*-pozytywne, jednakże przeważnie komórki te wraz z tymi z rombomeru piątego ulegają apoptozie [14].

NCC z rombomeru czwartego migrują do drugiego łuku skrzelowego i wykazują wyłącznie ekspresję genu *Hoxa2* (Rys. 3D). Są konieczne do prawidłowego rozwoju szkieletu gnykowego. Inaktywacja tego genu powoduje, że z komórek tych rozwijają się struktury charakterystyczne dla pierwszego łuku skrzelowego [15]. Z kolei ekspresja tego genu wraz z *Hoxa3* oraz *Hoxb3* w przedniej części fałdów nerwowych powoduje zahamowanie rozwoju szkieletu twarzowego [16]. Ponieważ jednym z czynników odpowiedzialnych za ten proces jest FGF8, potwierdza to wykazaną wcześniej wzajemną zależność między tym białkiem a proliferacją NCC w domenie *Hox*-negatywnej. Nieprawidłowy wzór ekspresji genu *Hoxa2* jest obserwowany u myszy z zaburzeniami rozwoju tyłomózgowia na etapie embrionalnym. Ponieważ za prawidłowy rozwój tej części mózgu odpowiedzialny jest FGF8, jak również jego partner WNT1, istnieje nie do końca jeszcze poznana ścieżka sygnałowa między tymi trzema genami. Dodatkowo *Hoxa2* odgrywa podstawową rolę w kształtowaniu się granic między obszarami ekspresji poszczególnych genów *Hox*, gdyż u myszy z mutacją w tym genie brak granic między rombomerami pierwszym i drugim, oraz drugim i trzecim [17].

4. Podsumowanie

Wszystkie wspomniane wyżej procesy przebiegają na bardzo wczesnych etapach, w momencie kiedy dopiero zaczyna kształtować się układ krążenia, więc tym bardziej

czynniki wydzielane przez tworzący się układ nerwowy oraz struktury mu towarzyszące mogą wpływać na dalszy rozwój zarodka. Współdziałanie morfogenów oraz genów homeotycznych jest konieczne do prawidłowego rozwoju całego organizmu. Sygnałem inicjującym ten proces są prawdopodobnie odpowiednie stężenia morfogenów w poszczególnych częściach organizmu, które następnie po kolei włączają ekspresję genów homeotycznych. W późniejszych etapach zachodzi wzajemna aktywacja w zależności od organu, w którym czynniki te muszą współdziałać. Nie dotyczy to tylko naszego układu nerwowego czy struktur szkieletu czaszkowego, ale każdego organu w naszym organizmie. To jest tylko jedna mała część z rozbudowanej i skomplikowanej sieci powiązań. Pomimo tego, że pełnej wiedzy na temat genów homeotycznych i morfogenów nie będziemy mogli wykorzystać do leczenia dzieci dotkniętych ich mutacjami, gdyż zazwyczaj są one letalne jeszcze w okresie życia płodowego, być może zrozumienie ich współdziałania umożliwi nam kiedyś leczenie chorób neurodegeneracyjnych czy tworzenie organów *in vitro* z komórek macierzystych tylko za pomocą indukcji odpowiednich genów.

5. Bibliografia:

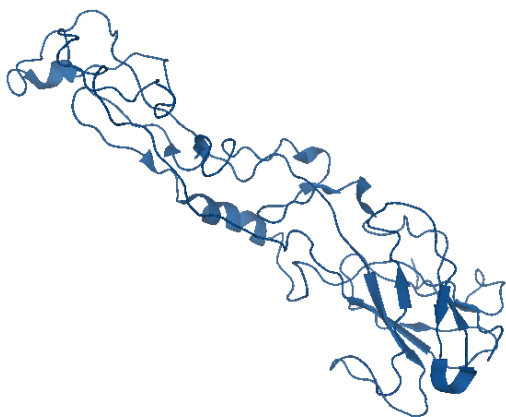
1. Bielańska – Osuchowska Z, Zarys organogenezy. PWN, 2004.
2. <http://www.med.umich.edu/lrc/coursepages/M1/embryology/embryo/08nervoussystem.htm>
3. Vernay B et al. Otx2 regulates subtype specification and neurogenesis in midbrain. *J Neurosci.* 2005 May 11;25(19):4856-67.
4. Wittmann D et al. Spatial analysis of expression patterns predicts genetic interactions at the mid-hindbrain boundary. *PLoS Comput Biol.* 2009 Nov;5(11):e1000569. Epub 2009 Nov 20.
5. Nakamura H et al. Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005 Sep;49(2):120-6. Epub 2005 Jan 21.
6. Alexandre P et al. The isthmic organizer links anteroposterior and dorsoventral patterning in the mid/hindbrain by generating roof plate structures. *Development.* 2003 Nov;130(22):5331-8. Epub 2003 Sep 24.
7. Creuzet S et al. Reciprocal relationships between Fgf8 and neural crest cells in facial and forebrain development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 6;101(14):4843-7. Epub 2004 Mar 23.
8. Panhuysen M et al. Effects of Wnt1 signalling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region. *Mol Cell Neurosci.* 2004 May;26(1):101-11.
9. McMahon A et al. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell.* 1990 Sep 21;62(6):1073-85.
10. Prakash N et al. A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development.* 2006 Jan;133(1):89-98.
11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5015>
12. Puellas E et al. Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development.* 2004 May;131(9):2037-48.

13. Rhinn M et al. Cell autonomous and non-cell autonomous functions of Otx2 in patterning the rostral brain. *Development*. 1999 Oct;126(19):4295-304.
14. Ellies D et al. Apoptosis of premigratory Neural Crest Cells in rhombomeres 3 and 5: consequences for patterning of the branchial region. *Dev Biol*. 2002 Nov 1;251(1):118-28.
15. Santagati F et al. Temporal requirement of Hoxa2 in cranial neural crest skeletal morphogenesis. *Development*. 2005 Nov;132(22):4927-36. Epub 2005 Oct 12.
16. Creuzet S et al. Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head : insight from avian studies. *J Anat*. 2005 Nov;207(5):447-59.
17. Barrow J et al. Roles of Hoxa1 and Hoxa2 in patterning the early hindbrain of the mouse. *Development*. 2000 Mar;127(5):933-44.

HCV – ZMORA NASZYCH CZASÓW

1. Wstęp

Ewolucja jest rwącą rzeką, w której płyną wszystkie byty na przestrzeni milionów pokoleń. Wszystkie takie wodne obiekty w przeciągu stuleci zmieniają swój bieg za sprawą wymywania i nanoszenia osadów na swoich brzegach. Dzięki temu po pewnym czasie następuje stopniowa zmiana linii brzegowej, rzeka przemieszcza się coraz dalej, tworząc zakola. W skrajnych przypadkach, gdy dochodzi do przerwania linii brzegowej, rzeka zaczyna płynąć w zupełnie innym korycie, tworząc izolowany odcinek swojego starego biegu, czyli starorzecza. Procesu przemieszczania się koryta rzeki nie da się bezpośrednio uchwycić gołym okiem, ani specjalnymi aparatami do rejestracji wielodniowych zjawisk. Podobnie tyczy się ewolucji istot żywych i tworów natury mających ich cechy. Nie da się w przeciągu paru dni, ani tygodni, uchwycić zmian ewolucyjnych. Powodem tego jest przede wszystkim długość pojedynczej generacji istot żywych. To ograniczenie jest w dużym stopniu zniesione w wirusach, mających bardzo krótki cykl życiowy i specyficzny system powielania się, nastawiony na bardzo liczne zmiany w swojej informacji genetycznej. Dlatego u organizmów wyższych można jedynie badać ewolucje metodami pośrednimi, analizując wyniki i następstwa procesów



Rysunek1. Model struktury przestrzennej glikoproteiny E2 wirusa HCV. Źródło: PDB: 2agr, wymodelowane programem PyMol ver. 0.99

ewolucyjnych. Jednym z takich procesów jest przystosowanie się organizmów żywych, jak i tworów o ich cechach, do trwałego bytowania w środowisku. Zjawisko to dobrze ilustruje przystosowanie się patogenów do trwałego i łatwego szerzenia się wśród populacji różnych zwierząt i ludzi. Przykładem tego jest wirus zapalenia wątroby typu C, HCV (*Hepatitis C Virus*).

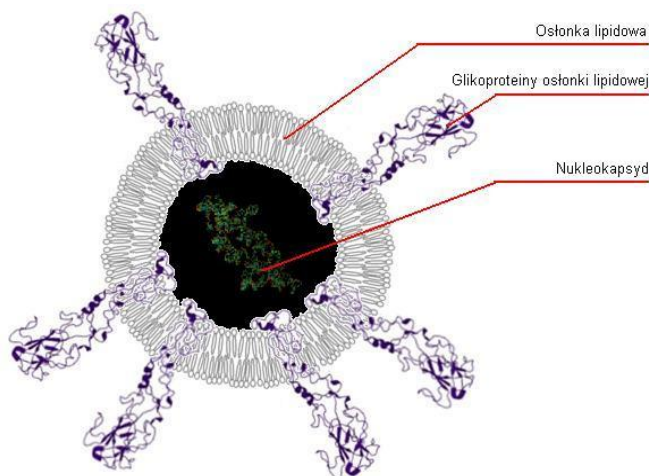
Wirus powodujący wirusowe zapalenie wątroby (WZW) typu C należy do rodzaju *hepacivirus* i rodziny *flaviviridae*, posiada kapsyd o średnicy około 50 nm. Należy do wirusów mających lipidową osłonkę, zbudowaną głównie z fosfolipidowych komponentów błony komórkowej żywych komórek. W tej wirusowej strukturze znajdują się glikoproteiny, specyficzne dla tego wirusa: E1 i E2. Te makromolekuły na jednym ze swoich końców posiadają część hydrofobową, która tkwi w osłonce wirionu. E1 i E2 są ligandami dla określonych receptorów, występujących na komórkach, w których replikuje się HCV. Rodzajów komórkowych receptorów, przez które cały wirus wchodzi do komórki gospodarza za sprawą endocytozy, jest bardzo wiele. Najważniejsze z nich to CD81, receptory LDL, jak i VLDL oraz receptor resztkowy klasy B (ang. *human scavenger receptor class B type I* = SR-BI). Dzięki nim wirus jest w stanie infekować nie tylko komórki wątroby, ale również monocyty i limfocyty. Jednakże, według nowszych badań, forma replikatywna materiału genetycznego wirusa, o odmiennej sekwencji regionów hiperzmiennych w porównaniu do populacji wirusów HCV z wątroby, była znajdowana również w komórkach mikrogleju mózgu, trzustki czy nawet szpiku kostnego [14, 20, 23, 32, 33].

W procesie absorpcji do komórek istotne znaczenia ma glikoproteina E2 znajdująca się w osłonce wirusa. Glikoproteina E1 pełni jedynie funkcję pomocniczą w tym procesie. Na uwagę zasługuje fakt, że to właśnie glikoproteina E2 charakteryzuje się największą immunogennością i głównie przeciwko niej zwrócone są przeciwciała. Jednak te cząstki odpornościowe rozpoznają głównie region hiperzmienny HVR1, który podlega ogromnym zmianom za sprawą „błędów” polimerazy RNA wirusa. Dzięki temu odpowiedź humoralna układu odpornościowego jest nieskuteczna w walce przeciwko zakażeniu wirusem HCV. Układ odpornościowy napotyka nowe struktury HVR1, będące w E2 i wytwarza kolejne nowe rodzaje IgM, zwrócone przeciwko temu regionowi [14, 20, 22, 23, 31, 33].

Pod osłonką wirionu znajduje się nukleokapsyd, zbudowany z białek C i kwasu nukleinowego, jakim jest jednoniciowy RNA o długości około 9,6 tys. nukleotydów. Materiał genetyczny wirusa, niesiony w wirionie, ma dodatnią polarność, to znaczy, że może podlegać translacji w żywych komórkach gospodarza bez uprzedniego przepisywania informacji genetycznej na drugą nić. Cały genom wirusa HCV składa się z regionu kodującego dziesięć genów oraz z regionów 3'UTR i 5'UTR kolejno na końcach 3' i 5' nici kwasu rybonukleinowego. Końce te posiadają specyficzną strukturę drugo i trzeciorzędową zwaną IRES. Koniec 5' RNA wirusa HCV ma strukturę IRES, o długości przeszło 340 nukleotydów, umożliwiającą łączenie się z podjednostką 40S

rybosomu w kompleksie z białkami eIF3, eIF2 i z inicjatorowym tRNA. Dzięki temu translacja białek wirusowych przebiega w sposób bardzo wydajny z ominięciem normalnego, dla większości translacji składania kompleksu czynników translacyjnych. Na drugim końcu materiału genetycznego wirusa znajduje się 3' UTR o nieco krótszej długości, liczący od 170 do 250

nukleotydów, w zależności od genotypu wirusa. Struktura ta jest rozpoznawana przez polimerazę wirusową i dzięki niej jest możliwa replikacja ssRNA wirusa wewnątrz komórek gospodarza [12, 19, 20, 33, 34].



Rysunek 2. Schemat wirionu HCV.

Źródło: rycina własna.

3. Wnikanie do komórek, replikacja i początek choroby

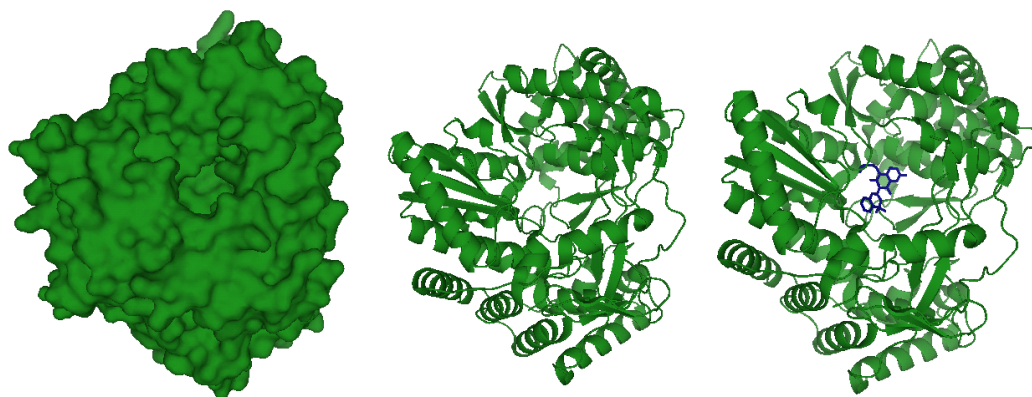
Wirus HCV rozwija się jedynie w komórkach ludzkich, oraz w znacząco gorszym stopniu, w komórkach małp bardzo blisko spokrewnionych z człowiekiem. W krwi wirus przemieszcza się albo w postaci wolnej, albo w LDL, dzięki czemu jest niewidoczny dla układu odpornościowego. W niedalekiej przeszłości powodem ograniczenia badań nad tym wirusem był brak odpowiedniej linii komórkowej, w której namnażałby się HCV. Replikacja HCV w organizmach szympanсів przebiega bardzo wolno, a niekiedy nieefektywnie. Dopiero postęp w inżynierii genetycznej i biologii komórki pozwolił na stworzenie nowych zwierząt transgenicznych i linii komórkowych podatnych na zakażenie wirusem HCV. Jedną z tych linii komórkowych jest ludzka linia komórkowa raka wątroby – Huh-7 (*human hepatoma cell line 7*) [15, 20, 28, 33].

Po zasocjowaniu się z odpowiednim receptorem komórkowym wirus HCV przechodzi do komórki gospodarza na drodze endocytozy. W cytoplazmie dochodzi do szeregu reakcji biochemicznych za sprawą różnych komponentów wirionu. Białka nukleokapsydu C oddziałują z różnymi cząstkami sygnałowymi, między innymi z TNF α . Następstwem tego może być uruchomienie mechanizmów zmierzających do proliferacji zakażonej komórki gospodarza i w następstwie do jej nowotworzenia. Inne białko

wirionu – E2 – po połączeniu się z receptorem CD81 unieczynnia komórki NK w swoich funkcjach odpornościowych. We wnętrzu komórki białko to ma jeszcze inną funkcję. E2 posiada strukturę prawie identyczną, co fosforylowany fragment eIF-2α, dzięki temu przerywa kaskadę sygnałową zmierzającą do apoptozy. Kaskada ta ma swój początek w rozpoznaniu powszechnej w replikacji wirusa struktury dsRNA w komórce przez kinazę PKR. Kinaza ta z kolei fosforyluje eIF-2α. W dalszych etapach następuje zatrzymanie biosyntezy wszystkich białek w zakażonej komórce [2, 10, 14, 23, 26].

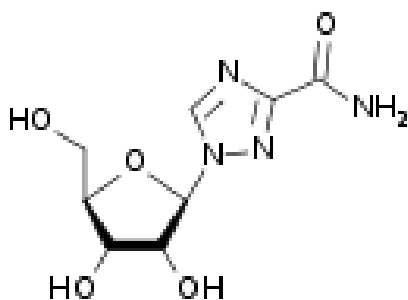
Po wnikięciu do komórki gospodarza wirus HCV przejmuje kontrolę nad maszyną biosyntezy makrocząsteczek. Jego koniec 5' (+) ssRNA przyłącza się do podjednostki 40S rybosomu, będącej w kompleksie z białkami eIF3, eIF2 i inicjatorowego tRNA. Po rozpoznaniu kodonu AUG na nici wirusowego RNA cały proces biosyntezy białka przechodzi do etapu elongacji. Po tym etapie zostanie zsyntetyzowany długi łańcuch polipeptydowy o długości ponad trzech tysięcy aminokwasów. Następnie, polipeptyd ten podlega katalitycznemu cięciu w ściśle określonych miejscach. Dzięki temu powstają wszystkie wirusowe białka strukturalne jak i niestrukturalne. Do najlepiej poznanych białek niestrukturalnych należą NS3, będąca proteazą serynową oraz NS5B, czyli wirusowa polimeraza RNA na matrycy RNA [2, 20, 33].

Po biosyntezie odpowiedniej ilości strukturalnych białek matryce do syntezy kolejnych wirusowych nici materiału genetycznego przechodzą do retikulum endoplazmatycznego, tworząc z wirusowymi białkami kompleksy. Wirusowe białko



Rysunek 3. Model białka NS4B. Od lewej: Struktura przestrzenna białka; struktura trzeciorzędowa białka; struktura trzeciorzędowa białka z inhibitorem NN2 (1-(2-cyclopropylethyl)-3-(1,1-dioxido-2h-1,2,4- benzothiadiazin-3-yl)-6-fluoro-4-hydroxyquinolin-2(1h)-one) w centrum katalitycznym enzymu.

Źródło struktur: PDB: 1c2p, 2giq. Rycina własna



Rysunek 4. Wzór strukturalny
Rybawiryny. Źródło: Wikipedia.

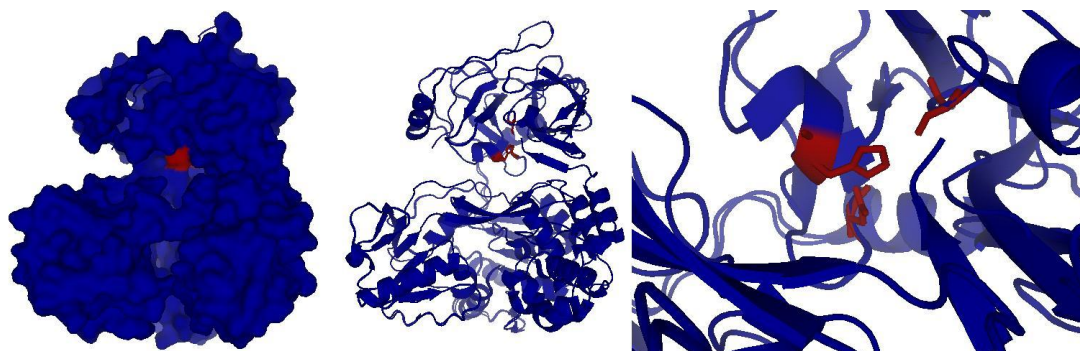
NS4B, o właściwościach silnie hydrofobowych, łączy się z komponentami tratw lipidowych. Z kolei NS5B, wirusowa polimeraza RNA na matrycy RNA, przylączy się do białka hVAP-3 (ang. *human vecicle associated protein 3*). Dzięki tym dwóm białkom dochodzi do wpuklenia się błony retikulum endoplazmatycznego, tworząc uchyłek o średnicy około 80 nm. Ponadto wątrobowo-specyficzna mała cząstka regulatorowego RNA miR-122 przylączy się do regionu 5' UTR, będącego na nici wirusowego RNA. Proces ten nie prowadzi do degradacji RNA, wręcz przeciwnie, pomaga cząstce materiału genetycznemu w interakcji z maszyną replikacyjną wirusa wewnątrz uchyłków retikulum endoplazmatycznego. Dzięki lokalizacji wirusowego RNA w tych uchyłkach replikowany materiał genetyczny wirusa jest osłonięty przed enzymami proteolitycznymi i nukleazami gospodarza, a jednocześnie poprzez dyfuzję, jest zaopatrywany w trifosforany nukleotydów potrzebne do biosyntezy kolejnych nici wirusowego RNA [13, 17].

Proteina NS5B jest białkiem występującym powszechnie w izolowanych uchyłkach retikulum endoplazmatycznego podczas infekcji komórki wirusem HCV. Jest polimerazą RNA na matrycy RNA. Dzięki temu, że w komórce gospodarza nie ma żadnych enzymów o takich właściwościach katalitycznych istnieje możliwość terapii lekowej zwróconej przeciwko tym rodzajom enzymów. Najbardziej powszechnym lekiem przeciwwirusowym stosowanym w zakażeniu wirusem HCV jest rybawiryna. Jest ona analogiem guanozyny, która jest używana do syntezy wirusowego RNA przez wirusową polimerazę. Po wbudowaniu się zmienionej przez enzymy gospodarza rybawiryny do biosyntetyzowanej wirusowej nici RNA w miejsce adeniny albo guaniny paruje ona w kolejnych cyklach replikacyjnych z dowolnym nukleotydem. Dzięki temu dochodzi do poważnych błędów w sekwencji aminokwasowej białek wirusowych, kodowanych przez tak zmienione kwasy nukleinowe. Lek ten jest zażywany doustnie, razem z pegylowanym interferonem α 2b albo α 2a, aby zwiększyć działanie przeciwwirusowe tego analogu guanozyny. Rybawiryna jest transportowana wewnątrz erytrocytów, co bardzo często kończy się spadkiem ilości hemoglobiny we krwi. Wyleczalność chorych po terapii rybawiryną szacuje się na 60 %. Ponadto, bada się inne leki blokujące replikację wirusa HCV, jak i unieczynnijające jego polimerazę. Jednym z

nich jest walopicytabina, będąca inhibitorem polimerazy wirusa HCV [1, 2, 16, 20, 24, 33, 34].

Innym nie mniej ważnym białkiem występującym w cyklu replikacyjnym wirusa HCV jest proteina NS3, mająca aż trzy różne właściwości katalityczne. Są nimi proteinaza serynowa, helikaza i NTP-aza. Białko to z polimerazą wirusową pełni kluczową funkcję w cyklu replikacyjnym wirusa HCV. Podczas biosyntezy polipeptydu o długości ponad trzech tysięcy aminokwasów enzym NS3 w kompleksie z NS4A, zwiększającym jego aktywność katalityczną, łączy wirusowy polipeptyd na mniejsze fragmenty, odpowiadające wirusowym białkom. Dwie kolejne funkcje katalityczne białka NS3 uczestniczą w replikacji wirusowego RNA. Domena odpowiedzialna za właściwości helikazy niszczy struktury drugo i trzeciorzędowe RNA utrudniające replikację. Natomiast domena odpowiedzialna za właściwości NTP-azowe dostarcza energii, potrzebnej do replikacji RNA [2, 20, 33].

Innym białkiem niestrukturalnym, kodowanym przez genom wirusa HCV jest proteina NS5A. Białko to występuje w wirusowym kompleksie replikacyjnym na retikulum endoplazmatycznym. Ponadto, białko zmniejsza ekspresję genu kodującego białko p21WAF1. Białko p21WAF1 jest inhibitorem kinaz cyklicznych, uczestniczących w indukcji proliferacji komórek. W normalnych warunkach transkrypcja białka p21WAF1 jest wywołana fosforylacją białka p53. Dzięki temu wirus HCV hamuje apoptozę zakażonej komórki gospodarza [20, 23, 33].

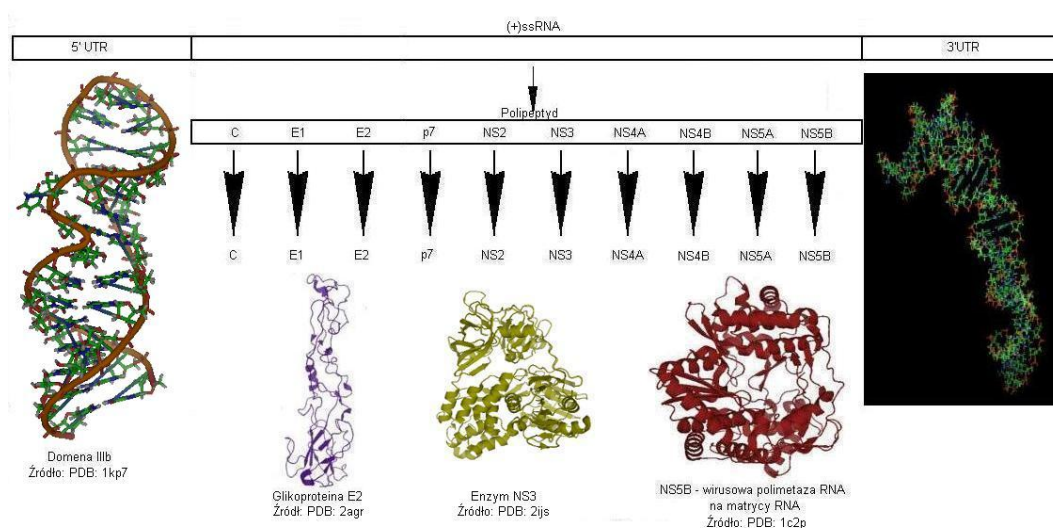


Rysunek 5. Model białka NS3. Od lewej: Struktura przestrzenna białka; struktura trzeciorzędowa białka; zbliżenie na triadę katalityczną proteazy serynowej. Reszty aminokwasowe budujące centrum reakcyjne proteinazy oznaczono kolorem czerwonym. Źródło struktur: PDB: 2ijs. Rycina własna.

4. Od replikacji do wyniszczenia zakażonego organu i organizmu

Wirus HCV po złożeniu wirionów odpączkowuje od błony zyskując osłonkę lipidową z białkami E1 i E2. Cały proces wydostawania się wirionów HCV do przestrzeni międzykomórkowej nie charakteryzuje się obfitą lizą komórek i zniszczeniem tkanek. Głównym powodem rozległych uszkodzeń zakażonego narządu jest odpowiedź komórkowa układu odpornościowego, która jest naturalnym mechanizmem eliminujących wirusa HCV. Jednak te mechanizmy odpornościowe nie pozwalają całkowicie zwalczyć zakażenia wirusem HCV. Postępujący proces chorobowy przebiega bardzo wolno. Dopiero po parunastu latach następuje znaczne wyniszczenie wątroby, objawiające się marskością oraz zmianami metabolicznymi. Występuje również powolne stłuszczenie wątroby wywołane przez insulinooporność. Oprócz marskości i stłuszczenia wątroby występuje również rak wątroby pośrednio wywoływany przez wirusa HCV. Ponadto, u trzech czwartych zakażonych wirusem HCV osób nie występują żadne objawy chorobowe wskazujące na rozwój choroby, co znacznie utrudnia wykrycie nosicielstwa i zastosowanie terapii farmakologicznej [4, 14, 16, 21, 25].

Nie mniej jednak, podczas postępu zakażenia wirusem HCV nie tylko wątroba zostaje uszkodzona, ale również inne narządy takie jak mózg, tarczyca czy trzustka. Jednym z głównych powodów uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego jest zakażenie i rozwój wirusa w komórkach mikrogleju. Następnie, komórki te wydzielają ogromną ilość związków chemicznych uszkadzających pośrednio komórki nerwowe. Przykładem tych związków są duże stężenia tlenu azotu (II) czy aminokwasów, które pod wpływem stresu oksydacyjnego indukują apoptozę neuronów i w następstwie objawy neuropsychiatryczne. Ponadto, w zakażonym organizmie wytwarzają się przeciwciała autoimmunoagresywne, zwrócone przeciwko cząstkom płytek krwi typu glikoprotein GPIIb/IIIa czy komórkom tarczycy. Powodem tego jest występowanie reakcji krzyżowej między białkami wirusa a biocząsteczkami, znajdującymi się w różnych tkankach. Przykładem tego jest siedem epitopów na wirusowej polimerazie ES5B, podobnych do tyreoperoksydazy. Enzym ten uczestniczy w biosyntezie hormonów tarczycy: tyroksyny i trójiodotyroniny i jest powszechnie występującym białkiem w komórkach tarczycy [18, 24, 30, 32].



Rysunek 6. Schemat ukazujący białka kodowane przez genom wirusa HCV.
Źródło: rycina własna.

5. Epidemiologia i diagnostyka - problem HCV

Podanie dokładnej liczby nosicieli wirusa HCV jest niemożliwe, ponieważ zakażenie tym wirusem jest w trzech czwartych przypadków bezobjawowe. Szacuje się, że w Polsce około 1,5 % populacji, czyli około sześćset tysięcy osób, jest nosicielem tego wirusa. Jest to znacznie poniżej średniej światowej, która utrzymuje się na poziomie 3,1 % populacji, czyli około 170 milionów. Największy procent nosicieli w porównaniu do liczby ludności jest w krajach afrykańskich. Przewiduje się, że zakażonych jest ponad 5 % populacji, czyli około 32 milionów osób. Najwięcej zakażeń wirusem HCV dochodzi za sprawą kontaktu z zakażoną krwią, na przykład używanie zakażonych igieł, przy transfuzji krwi czy dializach. Dochodzi również do zakażenia poprzez drogę płciową i okołoporodową czy nawet poprzez zabieg stomatologiczny albo wykonanie tatuażu [3, 5, 6, 8, 9, 11, 33].

Wirus HCV charakteryzuje duża heterogenność, spowodowana szybkością mutacji oraz bezobjawowym rozwojem i łatwym zakażaniem kolejnych osób. Po porównaniu sekwencji wszystkich genotypów wirusa HCV okazuje się, że poszczególne nici materiału genetycznego wirusa różnią się aż w 30% całej sekwencji. Dzięki porównaniom odcinków wirusowego RNA wyróżniamy aż sześć genotypów numerowanych od 1 do 6. Ponadto wyodrębniono podtypy tych genotypów, które oznaczamy małymi literami abecadła łacińskiego po liczbie oznaczającej genotyp. Dzięki odmiennej budowie NS5B podtypy 1a i 1b są bardziej odporne na terapię z wykorzystaniem interferonu α . Wszystkie genotypy wirusa HCV, jak i jego podtypy są

typowe dla określonych regionów świata. W Polsce spotykane są głównie genotypy 1b oraz w mniejszym stopniu 3a. Pod wpływem migracji i podróży ludności następuje stopniowe przemieszczanie się poszczególnych genotypów wirusa HCV. Przykładem tego jest coraz więcej przypadków zakażenia w Polsce genotypem 1a i 4. Genotypy te występują głównie kolejno w Europie Zachodniej i Ameryce oraz genotyp 4 w Afryce [8, 22, 24].

Dzięki stworzeniu odpowiednich testów, wykrywających nosicielstwo wirusa HCV, została zmniejszona liczba zakażeń w wyniku transfuzji, dializy czy transplantacji narządu. Testy diagnostyczne wykrywają wirusa HCV w sposób pośredni, bądź bezpośredni. Najpowszechniejszym z nich jest badanie przeciwciał w osoczu zwróconych przeciw różnym epitopom występującym na wirusowych proteinach. Jednak ta metoda diagnostyczna ma podstawową wadę. Nie wykrywa obecności wirusa w czasie tzw. „okienka serologicznego”, które niekiedy trwa do roku czasu od zakażenia. Innym niemniej ważnym testem diagnostycznym jest wykrycie RNA wirusa poprzez RT-PCT. Jednak ze względu na możliwą znikomą liczbę genomów HCV we krwi ta metoda diagnostyczna jest w większości przypadków nieskuteczna [7, 9, 22, 33].

6. Nowe medykamenty i eliminacja wirusa HCV

Obecnie w zaawansowanych laboratoriach medycznych prowadzone są badania nad nowymi lekami, działającymi na różne etapy cyklu rozwojowego wirusa HCV. Możliwości działania nowych leków są bardzo różne. Jednym z nich jest blokada translacji przez przyłączenie się do 5' UTR wirusowego RNA antysensownego fragmentu RNA, o nazwie ISIS 14803. Innym lekami są inhibitory proteazy wirusowej NS3. Przykładem medykamentu o takich właściwościach jest BLIN 2061, SCH 503034 czy VX-950. Ponadto prowadzone są badania nad ulepszeniem terapii interferonowej, poprzez modyfikację tej biocząsteczki. Przykładem tego jest albuferon czyli chimeryczne białko interferonu i ludzkiej albuminy. Dzięki takiemu połączeniu lek ten utrzymuje się o wiele dłużej we krwi pacjenta [15, 27].

Stały rozwój nauk medycznych pozwolił na opanowanie wielu chorób. Miejmy nadzieję, że w najbliższych dziesięcioleciach problem z zakażeniami wirusem HCV zostanie wyeliminowany.

7. Literatura

1. Adamek A *et al.* Odległe wyniki leczenia interferonem alfa 2B i rybawiryną chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C w warunkach leczenia standardowego. *Przegl Epidemiol* 2007, 61: 765-770.
2. Bartenschlager R *et al.* Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000, 81: 1631-1648.
3. Bobel D *et al.* Wirusowe zapalenie wątroby typu C w 2006 roku. *Przegl Epidemiol* 2008, 62: 325-331.
4. Boroń-Kaczmarek A Mechanizm zaburzeń metabolicznych w przebiegu zakażenia HCV. *Przegl Epidemiol* 2006, 60: 701-705.
5. Borzęcka B *et al.* Program wczesnego wykrywania zakażenia HCV. *Przegl Epidemiol* 2007, 61: 733-738.
6. Brackowska B *et al.* Epidemiologia zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) w Polsce i na świecie. *Wiad Lek* 2002, 55 supl. Cz. 1: 61-68.
7. Brojer E Badania serologicznych i molekularnych markerów HCV u dawców krwi w Polsce. *Przegl Epidemiol* 2005, 59: 511-517.
8. Brojer E *et al.* Genotypy HCV u polskich dawców krwi w okresie 1995-2007. *Przegl Epidemiol* 2008, 62: 163-169.
9. Brojer E *et al.* Rozpoznanie wczesnego etapu zakażenia HCV u dawców krwi poprzez badanie RNA HCV - nowe wyzwanie dla transfuzjologii i hepatologii. *Pol Merkuriusz Lek* 2004, 17 (100): 321-325.
10. Bugli F *et al.* Mapping B-Cell Epitopes of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Using Human Monoclonal Antibodies from Phage Display Libraries. *J Virol* 200, 20 (75): 9986-9990.
11. Chlabicz S Pracownik służby zdrowia jako źródło zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C. *Pol Merkuriusz Lek* 2005, 19 (110): 225-228.
12. Dutkiewicz M *et al.* Struktura regionów niekodujących RNA wirusa zapalenia wątroby typu C. *Postepy Biochem* 2006, 52 (1): 62-71.
13. Figlerowicz M *et al.* Wpływ małych regulatorowych RNA na przebieg zakażeń wirusowych - nowe strategie leczenia zakażeń HCV. *Przegl Epidemiol* 2006, 60: 693-700.
14. Hee Lee S *et al.* E2 of Hepatitis C Virus Inhibits Apoptosis. *J Immunol* 2005, 175: 8226-8235.
15. Inglot *et al.* Terapia eksperymentalna zakażenia HCV. *Przegl Epidemiol* 2005, 59: 525-533.
16. Inglot M *et al.* Badanie wybranych cytokin w surowicy krwi pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C nieleczonych oraz leczonych *interferonem alfa i rybawiryną*. *Wiad Lek* 2008, 61 (1-3): 13-18.
17. Jopling C Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochem Soc Trans* 2008, 36: 1220-1223.
18. Kamińska A *et al.* Pozawątrobowa replikacja wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV). *Przegl Epidemiol* 2003, 57: 317-320.
19. Kieft J *et al.* The Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site Adopts an Ion-dependent Tertiary Fold. *J Mol Biol* 1999, 292: 513-529.
20. Kowalo-Piaskowska A Wirus zapalenia wątroby typu C - budowa i replikacja a możliwości terapeutyczne i zjawisko oporności. *Postepy Biochem* 2006, 52 (4): 399-407.
21. Łapiński T *et al.* Aktywność wybranych cytokin u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV. *Przegl Epidemiol* 2007, 61: 747-754.
22. Magdzik W Wirusowe zapalenie wątroby typu C. Najbardziej istotne aspekty epidemiologiczne. *Przegl Epidemiol* 2006, 60: 751-757.
23. Nitkiewicz J Przewlekłe zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C - mechanizmy "ucieczki immunologicznej" wirusa. *Przegl Epidemiol* 2004, 58: 423-433.
24. Ołdakowska-Jedynak U *et al.* Przebieg zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C po przeszczepie wątroby. *Pol Merkuriusz Lek* 2005, 19 (110): 220-224.

25. Panasiuk A et al. Apoptoza w tkance wątrobowej w zakażeniu HCV. *Przegl Epidemiol* 2005, 59: 415-421.
26. Panasiuk A et al. Czynniki wzrostowe w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C. *Przegl Epidemiol* 2007, 61: 559-566.
27. Pawłowska M et al. Leczenie przewlekłego zapalenia wątroby typu C - nowe leki, nowe nadzieje. *Przegl Epidemiol* 2006, 60: 725-730.
28. Perlemuter G et al. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J* 2002, 16: 185-194.
29. Piszko P et al. Zaburzenia endokrynologiczne związane z zakażeniem HCV. *Przegl Epidemiol* 2006, 60: 707-714.
30. Sowińska E et al. Aspekty diagnostyczne i terapeutyczne małopłytkowości indukowanej zakażeniem wirusem C zapalenia wątroby (HCV - TP). *Przegl Epidemiol* 2007, 61: 439-448.
31. von Hahn T et al. Hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 2007.
32. Wawrzynowicz-Syczewska M Przewlekłe zakażenie HCV - choroba ciała czy choroba duszy? *Przegl Epidemio* 2005, 59: 611-619.

MIKRORNA – ZNACZENIE W TERAPII GENOWEJ

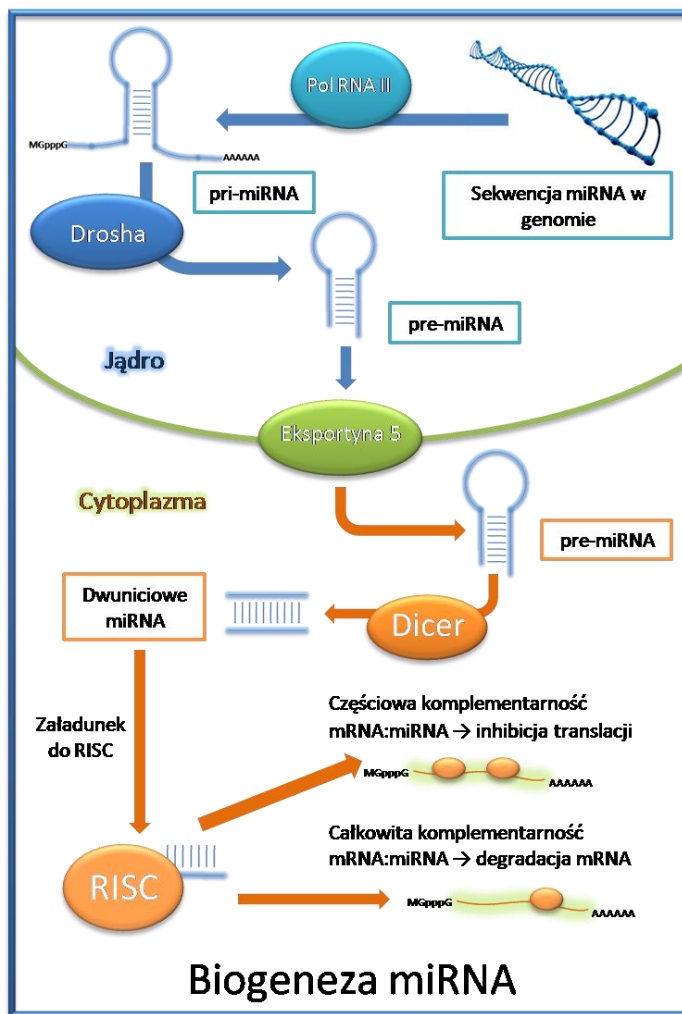
1. Wstęp

Terapia genowa definiowana jako dostarczanie do komórek kwasów nukleinowych o własnościach leczniczych wydaje się jedną z najbardziej obiecujących strategii medycyny molekularnej. Rewolucja w rozumieniu roli cząsteczek RNA w biologii komórki zainicjowana odkryciem zjawiska interferencji RNA (RNAi) w badaniach na nicieniu *Caenorhabditis elegans* [1] zwróciła uwagę na potencjalne kliniczne zastosowania tych molekuł [2, 3]. Większość z dotychczasowych projektów skupiona była na zastosowaniu krótkich dwuniciowych cząsteczek RNA biorących udział w szlaku RNAi nazywanych siRNA (short interfering RNA), powodujących wyciszenie ekspresji pojedynczych genów przez degradację transkryptów o regionach ściśle komplementarnych do sekwencji siRNA [4].

Zupełnie nowe możliwości wydaje się oferować druga klasa małych niekodujących cząsteczek RNA nazwanych miRNA, będących endogennymi regulatorami ekspresji wielu genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Od czasu odkrycia genu *lin-4* w *C. elegans* w 1993 roku, kodującego pierwsze poznane miRNA, opisano niemal 10 000 miRNA [5] oraz oszacowano, iż nawet do 30% ludzkich genów może podlegać regulacji przez te krótkie cząsteczki RNA [6]. Rosnąca liczba doniesień wskazuje na ich istotne znaczenie dla procesów regulacji rozwoju i różnicowania, kontroli podziałów komórkowych oraz apoptozy [7], a także w patologii wielu schorzeń [8]. Poniżej opisany zostanie mechanizm działania miRNA, ich znaczenie w rozwoju procesów chorobowych oraz możliwości ich wykorzystania dla potrzeb terapii genowej.

2. Biogeneza miRNA (Rys. 1)

Dojrzałe miRNA są jednonicowymi cząsteczkami niekodującego RNA o długości ok. 22 nukleotydów. Geny dla miRNA ulegają transkrypcji za pośrednictwem cząsteczek polimeraz RNA II lub III, tworząc w jądrze długie nici pri-miRNA, liczące do kilku tysięcy nukleotydów, które modyfikowane są przez dodanie czapeczki na końcu 5' (MGpppG) oraz poliadenylację na końcu 3'. Pri-miRNA są w jądrze przekształcane przez kompleks enzymatyczny Drosha (o aktywności RNazy III) oraz białka wiążącego



Rysunek 1. Szlak biogenezy miRNA. Geny miRNA są przepisywane z kodujących je sekwencji w genomie najczęściej przez polymerazę RNA II, a powstałe transkrypty pri-miRNA podlegają modyfikacjom końca 5' (czapeczka) i 3' (ogon poliadenylowy). Ulegają one obróbce przez białka Drosha i Pasha polegającej na wycięciu rejonu o strukturze spinki do włosów, dzięki czemu powstają cząsteczki pre-miRNA o długości około 70 nukleotydów. pre-miRNA są eksportowane z jądra przez transporter jądrowy eksportynę 5 mechanizmem zależnym od białka Ran związanego z GTP. W cytoplazmie pre-miRNA ulega cięciu przez enzym Dicer do dwuniciowych cząsteczek o długości ok. 22 nukleotydów. Tzw. nić wiodąca duplesu ulega preferencyjnej inkorporacji do kompleksu RISC (*RNA-induced silencing complex*). Wysoki stopień komplementarności transkryptu do związanej z RISC nici miRNA skutkuje degradacją transkryptu, natomiast częściowa komplementarność powoduje zahamowanie translacji [9]

dwuniciowe RNA Pasha (u człowieka DGCR8) do pre-miRNA o długości ok. 70 nukleotydów, które posiadają wewnątrzcząsteczkowe regiony komplementarności powodujące fałdowanie w struktury przypominające spinkę do włosów.

Molekuły pre-miRNA są transportowane do cytoplazmy dzięki aktywności transportera eksportyny 5 współdziałającego z białkiem Ran wiążącym GTP. Następnie kolejny enzym, Dicer, o aktywności RNazy III, tnie pre-miRNA do postaci dwuniciowych rybonukleotydów o długości 18-24 reszt. Te krótkie cząsteczki ulegają załadunkowi do związanego z miRNA kompleksu RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) zawierającego m. in. białka z rodziny Argonautów. Nić duplesu, której koniec 5' jest termodynamicznie mniej stabilny (słabiej związany z drugą nicią - wzbogacony w

pary A:U), nazywana nicią wiodącą (ang. *guide strand*), podlega preferencyjnej inkorporacji do kompleksu, natomiast druga, nazywana nicią pasażerską (ang. *passenger strand*) jest degradowana. Dojrzałe miRNA w postaci nici wiodącej zasocjowanej z towarzyszącym wielobiałkowym kompleksem wiąże się do docelowych transkryptów posiadających komplementarne sekwencje zwykle w rejonie 3' UTR. Efekt wiązania prawdopodobnie zależy od stopnia komplementarności mRNA do dojrzałego miRNA. Całkowita lub niemal całkowita komplementarność skutkuje cięciem prowadzącym do degradacji transkryptu, w przypadku niepełnej komplementarności dochodzi do represji translacji [9].

2. Różnice pomiędzy miRNA a siRNA.

Drugą wspomnianą już klasą krótkich niekodujących RNA biorących udział w regulacji ekspresji genów są siRNA różniące się od miRNA głównie pochodzeniem. siRNA powstają przede wszystkim w wyniku cięcia długich dwuniciowych łańcuchów RNA lub długich rejonów o strukturze typu spinki do włosów, przeważnie egzogenne pochodzenia np. genomów wirusowych, transpozonów. Przeciwnie, miRNA są pochodzenia endogenne, kodowane przez sekwencje prekursorów w genomie i wydają się stanowić istotniejszy mechanizm regulacyjny w warunkach fizjologicznych [10].

3. Metody badania miRNA

Wszystkie odkryte sekwencje miRNA są umieszczane w powszechnie dostępnej internetowej bazie danych o nazwie „miRBase” [5], obecna 13. edycja bazy zawiera informacje o 9539 sekwencjach [11].

3.1 Metody bioinformatyczne

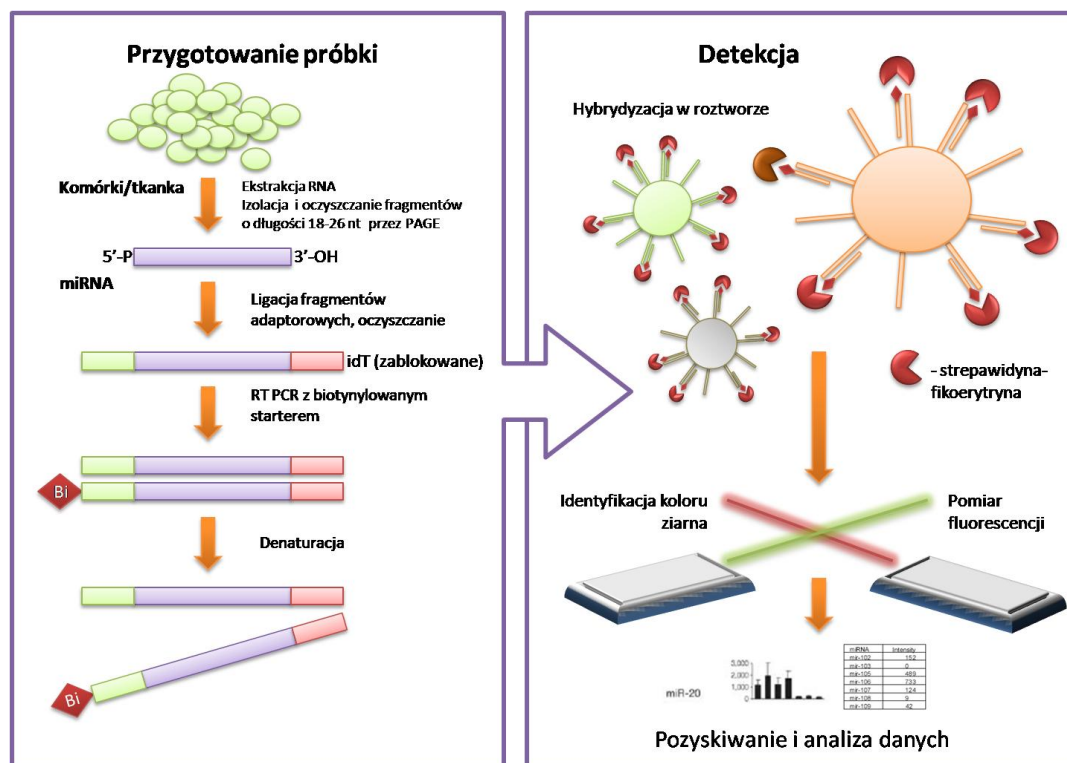
Identyfikacja sekwencji kodujących miRNA w genomie oraz przewidywanie regulowanych przezeń genów docelowych możliwe są za pomocą narzędzi bioinformatycznych. Wykorzystują one zwykle trzy cechy miRNA: 1) pochodzenie z prekursorowych transkryptów o dł. 70-100 nukleotydów o strukturze spinek do włosów, 2) wysoki stopień konserwacji sekwencji pomiędzy spokrewnionymi ewolucyjnie gatunkami oraz 3) charakterystyczny wzór ewolucyjnej dywergencji [12]. Jeszcze ważniejszym zastosowaniem metod komputerowych jest przewidywanie celów dla konkretnych miRNA. Typowymi kryteriami używanymi przez te aplikacje są: stopień komplementarności zasad ze szczególnym uwzględnieniem wykrywania całkowitej lub bliskiej całkowitej komplementarności w tzw. „*seed region*”, którym to terminem

określa się nukleotydy 2-8 od 5' końca miRNA, stabilność termodynamiczna przewidywanego kompleksu mRNA:miRNA, a także poziom konserwacji ewolucyjnej miejsc wiązania miRNA w rejonie 3' UTR genu w różnych gatunkach [12].

3.2 Badanie ekspresji miRNA

Podstawową techniką stosowaną do określania poziomu ekspresji różnych cząsteczek miRNA w różnych typach próbek jest analiza mikromacierzy zawierających związane do stałego podłoża (zwykle na szklanej płytce) komplementarne oligonukleotydy zoptymalizowane do efektywnej i specyficznej hybrydyzacji z badanymi miRNA. Uzyskane wyniki analiz mikromacierzy potwierdza się wykonując już komercyjnie dostępne testy ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy poprzedzonej odwrotną transkrypcją (*qRT-PCR*). Testy te umożliwiają również określanie poziomu pri-miRNA oraz pre-miRNA [13]. Możliwe jest także zastosowanie hybrydyzacji w roztworze z wyłapującymi polistyrenowymi ziarnami pokrytymi związanymi oligonukleotydowymi sondami komplementarnymi do analizowanych miRNA. Ziarna impregnowane są zmieszany w różnym stosunku dwoma barwnikami fluorescencyjnymi, co pozwala na używanie ok. 100 kolorów, z których każdy reprezentuje określone miRNA. Po izolacji frakcji małych RNA z hodowli komórkowej lub próbki tkanki dodawane są zarówno do końca 5', jak i 3' fragmenty adaptorowe. Następnie miRNA poddawane są odwrotnej transkrypcji, a potem 1) amplifikacji przez PCR z zastosowaniem wspólnego biotynylowanego startera, 2) hybrydyzacji z ziarnami wyłapującymi oraz 3) barwieniu przy pomocy fikoerytryny sprzężonej ze streptawidyną. Ziarna są analizowane przy użyciu cytometru przepływowego mierzącego kolor ziaren (rodzaj miRNA) oraz intensywność sygnału od fikoerytryny (stężenie miRNA) (Rys. 2) [14].

Najstarszą i wciąż stosowaną techniką jest analiza Northern Blot, obecnie wykonywana głównie w celu uzupełnienia i potwierdzenia rezultatów technik wysokiej przepustowości jak mikromacierze i *qRT-PCR* [15]. Weryfikacja regulowanych genów badana jest przez kotransfekcję konstruktami miRNA oraz mRNA z genem reporterowym np. lucyferazy z dołączoną w rejonie 3' UTR przewidywaną sekwencją wiązania miRNA. Hybrydyzacja *in situ* przy użyciu specjalnych oligonukleotydowych sond o wysokim powinowactwie pozwala analizować wzory ekspresji miRNA na utrwalconych formaliną skrawkach oraz zatopionych w parafinie fragmentach tkanek [13].



Rysunek 2. Metoda analizy ekspresji miRNA z zastosowaniem hybrydyzacji w roztworze z wylapującymi ziarnami i cystometrii przepływowej.

Po izolacji miRNA z hodowli komórkowej lub próbki tkanki, dołączeniu sekwencji adaptorowych oraz amplifikacji z użyciem biotynylowanego startera, tak przygotowane miRNA poddaje się hybrydyzacji w roztworze z polistyrenowymi ziarnami pokrytymi oligonukleotydami komplementarnymi do analizowanych miRNA. Ziarna impregnowane są dodatkowo mieszaniną dwóch barwników w różnych stosunkach, co pozwala na otrzymanie ok. 100 kolorów, z których każdy reprezentuje określone miRNA. Reszta biotyny pozwala na wybarwienie związanych z ziarnami miRNA przez fikoerytrynę sprzężoną ze streptawidyną. Ziarna są następnie analizowane przy pomocy cytometru przepływowego. Kolor ziaren odpowiada określonemu miRNA, natomiast gęstość sygnału od fikoerytryny pozwala na określenie poziomu ekspresji określonego miRNA w próbce [14].

3.3 Analiza funkcji miRNA

W przypadku nicieni oraz muszki owocowej dostępne są knockout'y (*red. ang. knockout* – organizmy z wyłączoną ekspresją danego genu/genów) specyficznych genów dla poszczególnych rodzin miRNA i możliwe jest wnioskowanie o ich funkcjach na podstawie zmienionych fenotypów. W przypadku ssaków uzyskano do tej pory myszy z knockout'em enzymu Dicer [16] oraz opublikowano pierwsze doniesienia o delecji genów specyficznych miRNA w modelu mysim [13]. Zmodyfikowane antysensowne oligonukleotydy (ASOs) dla hamowania specyficznych miRNA wydają się być

skutecznym podejściem w pracy z liniami komórkowymi. W badaniach *in vivo* wykazano efektywność modyfikowanych antysensownych RNA (tzw. „antagomirów”) [17]. Dużym utrudnieniem dla badania roli konkretnych cząsteczek miRNA jest regulowanie przez pojedyncze miRNA wielu docelowych genów oraz wpływ wielu miRNA na poziom ekspresji pojedynczego genu. Ta skomplikowana sieć interakcji dopiero zaczyna być rozwikływana.

4. Role biologiczne miRNA

Odkrycie miRNA związane było z badaniami procesu rozwoju i różnicowania, późniejsze badania ujawniły ich znaczenie w wielu procesach zarówno fizjologicznych, jak i chorobowych. Przypuszcza się, iż miRNA hamują ekspresję genów, które powinny być wyciszone w danym typie tkanki. Natomiast mRNA genów o wysokiej ekspresji, charakterystycznych dla danej tkanki bądź typu komórek, zwykle pozbawione są miejsc wiążących dla tzw. „seed sequence” takich regulatorowych miRNA. W ten sposób miRNA przyczyniają się do zapewnienia komórkowo i tkankowo specyficznego wzoru ekspresji genów [7].

4.1 Choroby nowotworowe

Badania wzorów i poziomu ekspresji miRNA w komórkach ludzkich nowotworów wykazały specyficzne zmiany sugerujące, iż jedną z oznak postępujących zmian neoplastycznych jest deregulacja komórkowych miRNA powiązana z towarzyszącymi zmianami genetycznymi i epigenetycznymi takimi jak delecje, amplifikacje, mutacje punktowe oraz zmiany wzoru i poziomu metylacji DNA. miRNA mogą pełnić zarówno funkcje genów supresorowych, jak i onkogenów, a miRNA odgrywające rolę w procesie transformacji nowotworowej określane są jako tzw. *oncomiRs*. Mogą one występować w rejonach niestabilnych genetycznie i często ulegających delecjom w komórkach rakowych, jak ma to miejsce w przypadku pierwszego, bezpośredniego powiązania między konkretnymi miRNA, a fenotypem komórek rakowych, którego dokonał zespół Calina i wsp. dla miR-15 i miR-16 [18]. Lokują się one w regionie 13q14, którego delecja występuje w ponad połowie przypadków przewlekłej białaczki limfatycznej (CLL – *chronic lymphocytic leukemia*). Poziomy ekspresji miR-15 i miR-16 pozostają w odwrotnej korelacji do poziomu Bcl-2 w CLL i wykazano, iż regulują one ekspresję genu dla tego białka na poziomie posttranskrypcyjnym. Represja Bcl-2 przez miRNAs w liniach komórek białaczkowych prowadzi do indukcji apoptozy, z tego względu miR-15

oraz miR-16 wydają się dobrymi kandydatami dla terapii genowej nowotworów wykazujących nadekspresję genu Bcl-2. [19].

Klaster miR-17-92 ma natomiast znaczenie dla rozwoju chłoniaków złośliwych oraz raków płuc i funkcjonuje jako onkogen. W komórkach tych locus dla sześciu miRNA z tej grupy na chromosomie 13 ulega często amplifikacji powodując ich podwyższoną ekspresję. Rola tych cząsteczek polega najprawdopodobniej na wspomaganiu proliferacji komórek poprzez przestawienie równowagi w ekspresji czynników transkrypcyjnych z rodziny E2F w stronę sprzyjającego podziałom E2F3, ze zmniejszeniem poziomu pro-apoptotycznego E2F1 [19, 20].

Rodzina miRNA *let-7* wykazuje charakter supresorowy. Cząsteczkom tym przypisuje się regulację ekspresji protoonkogenu białka RAS, które jest związaną z błoną cząsteczką sygnałową regulującą wzrost i różnicowanie komórek. Mutacje wspomnianego onkogenu są obecne w 15-30 % wszystkich ludzkich nowotworów. Utrata miejsc wiążących dla tej rodziny miRNA jest mechanizmem utraty represji onkogenu Hmga2 (ang. *high mobility group A2*) [21].

Sekwencje dla miRNA mogą pozostawać pod kontrolą genów supresorowych, jak w przypadku miR-34, bezpośrednio aktywowanego przez czynnik transkrypcyjny p53 po uszkodzeniu genomu [13]

Całościowe zmiany w ekspresji miRNA również mogą mieć znaczenie w procesie nowotworzenia. Badanie profilu ekspresji miRNA w 334 ludzkich rakach, liniach komórek rakowych i próbkach zdrowych tkanek wykazały, iż całościowy spadek poziomu wielu miRNA jest jedną z cech komórek rakowych [13, 14]. Fakt, iż najniższą ekspresję wykazywały komórki najslabiej zróżnicowanych guzów, wskazuje na znaczenie małych RNA w procesie różnicowania i hamowania proliferacji. Kumar i współpracownicy wykazali, iż globalny spadek poziomu miRNA, który może być wynikiem mutacji enzymów niezbędnych dla dojrzewania tych cząsteczek jak Drosha i Dicer, promuje transformację nowotworową [22]. Duże znaczenie miRNA w chorobach nowotworowych predysponuje je jako cel terapeutyczny oraz narzędzie diagnostyczne i prognostyczne [12, 13, 14].

4.2 Układ krwionośny

Niedawne badania wykazały wysoki poziom ekspresji miRNA w komórkach układu krążenia - kardiomiocytach, komórkach śródbłonna oraz mięśni gładkich naczyń. Duże zainteresowanie nimi wynika z rosnącej liczby dowodów na istotne funkcje regulacyjne w procesach rozwoju, różnicowania, proliferacji i apoptozy komórek układu naczyniowego oraz modulacji angiogenezy [23].

W 2005 roku opisano rolę miR-1 w różnicowaniu kardiomiocytów. Gen dla tego miRNA pozostaje pod bezpośrednią kontrolą regulatorów różnicowania w komórkach mięśniowych m. in. SRF-ów (ang. *serum response factors*), MyoD (ang. *myogenic differentiation factor D*) i Mef2 (ang. *myocyte-enhancing factor 2*) i jego ekspresja jest istotna dla prawidłowego rozwoju serca [24].

W komórkach mięśni gładkich naczyń, wykazano natomiast pro-proliferacyjne i anty-apoptotyczne własności miR-21. Jako prawdopodobne cele regulacyjne dla tego miRNA rozpoznano transkrypty fosfatazy PTEN oraz Bcl-2 [10]. Może to mieć znaczenie w przypadku podziałów komórek mięśni gładkich prowadzących do tworzenia warstwy neointymy w ścianach naczyń po angioplastyce, co może prowadzić do restenozы [15].

Cząsteczki miRNA, jak już wyżej wspomniano, mają również znaczenie dla procesu angiogenezy. Komórki ludzkiej linii śródbłónka żyły pępowinowej HUVEC (ang. *human umbilical vein endothelial cells*) są cennym modelem angiogenezy *in vitro* ze względu na zdolność tworzenia przypominających kapilary struktur w odpowiedzi na czynniki stymulujące. Wzór ekspresji miRNA w tych komórkach został niedawno scharakteryzowany. Opisano 15 miRNA o wysokiej ekspresji (przede wszystkim miR-221 i miR-222) posiadających jako cele mRNA dla receptorów głównych proangiennych czynników wzrostowych [25, 26]. Obniżenie poziomu enzymu Dicer w komórkach śródbłónka wpłynęło na ekspresję kilku istotnych regulatorów funkcji śródbłónka i angiogenezy m. in. Tie1, Tie2 VEGFR2, eNOS i IL-8. Wykazano ponadto, iż miRNA *let-7f* reguluje endogenne inhibitory angiogenezy trombospondynę-1. W przypadku patologicznej angiogenezy towarzyszącej rozwojowi nowotworów rolę przypisano grupie miR-17-92, której nadekspresja z użyciem wektorów retrowirusowych przyspieszała neowaskularyzację guzów [10]. Ponadto udział miRNA wykazano m. in. w regulacji procesów zapalnych w ścianach naczyń krwionośnych objętych miażdżycą [23], chorobie niedokrwiennej serca oraz arytmiiach [15].

4.3 Regulacja metabolizmu.

Pierwsze doniesienia o roli miRNA w metabolizmie pochodzą z obserwacji mutantów miR-14 *Drosophila melanogaster*, które charakteryzowały się powiększonymi kroplami lipidów w ciele tłuszczowym, podstawowym miejscu gromadzenia tłuszczów u tych owadów [27]. W fizjologii ssaków wykryto natomiast rolę miR-375 kontrolującego zależną od glukozy sekrecję insuliny przez regulację genu miotrofiny. Inhibicja tego miRNA objawia się wzmożonym wydzielaniem hormonu, co umożliwia branie pod uwagę tej cząsteczki miRNA jako celu dla rozwoju nowych strategii leczenia cukrzycy.

Funkcja specyficznego dla komórek wątroby miR-122 została zbadana przez zastosowanie antysensownych oligonukleotydów (ASOs), a na podstawie analizy mikromacierzy rozpoznano grupę genów o obniżonej ekspresji odpowiedzialnych za metabolizm lipidów. Zastosowanie ASOs skutkowało podwyższonym tempem oksydacji kwasów tłuszczowych oraz obniżoną syntezą kwasów tłuszczowych i steroli. Całkowite poziomy cholesterolu i triglicerydów w osoczu były obniżone w badanych myszach. W modelu otyłości u myszy (ob/ob) inhibicja miR-122 skutkowała ponadto obniżonym stłuszczeniem wątroby, stąd proponowane wykorzystanie tych obserwacji w leczeniu otyłości [17].

4.4 Infekcje wirusowe

Presja selekcyjna w ewolucji wielu wirusów działała w kierunku wykształcenia strategii uniknięcia aktywacji mechanizmów obronnych gospodarza. Wirusy o dużych genomach kodują często specyficzne białka inaktywujące systemy obronne komórki, m. in. odpowiedź interferonową oraz indukcję apoptozy. Wyłaniająca się istotna rola miRNA w regulacji wielu genów, w tym uczestniczących w szlakach sygnalizacyjnych i reakcjach immunologicznych [7], pozwala przypuszczać także o ich znaczeniu dla rozwoju infekcji wirusowych. Nie powinien dziwić fakt wykorzystywania przez wirusy szlaku miRNA dla modulacji ekspresji istotnych dla zakażenia genów przez kodowanie własnych cząsteczek miRNA w obrębie genomu wirusowego oraz wpływ na komórkowe miRNA. Wirusowe miRNA mogą posiadać kilka korzystnych dla patogenu charakterystyk, przede wszystkim są, w przeciwieństwie do białek, nieimmunogenne. Są ponadto stosunkowo krótkie, nawet poniżej 200 nukleotydów/par zasad ze wszystkimi cis-kodowanymi sekwencjami regulatorowymi, co jest dużą zaletą w kontekście ograniczonej pojemności większości genomów wirusowych [28].

Które z wirusów najprawdopodobniej korzystają z własnych miRNA? Większość wirusów RNA oraz pokswirusy (*Poxviridae*) należące do wirusów DNA przeprowadza replikację w cytoplazmie, co nie pozwoliłoby na obróbkę potencjalnych miRNA w jądrze przez Drosha, ponadto ich wycięcie doprowadziłoby do degradacji genomu wirusów RNA. Istotnie miRNA wykryto jedynie w genomach jądrowych wirusów DNA, w tym wszystkich herpeswirusów [29]. Dobrze poznano funkcję miRNA kodowanego przez wirus SV40 (ang. *simian virus 40*), które hamuje ekspresję dużego antygeny T wirusa w późnych etapach infekcji, chroniąc przed rozpoznaniem i lizą zainfekowanych komórek przez cytotoksyczne limfocyty T [28, 29].

Specyficzna tkankowo ekspresja niektórych miRNA może mieć znaczenie dla tropizmu niektórych wirusów oraz sprzyjać infekcji, jak to ma miejsce w przypadku

specyficznego dla hepatocytów miR-122. Interakcja tego miRNA z 5'UTR genomu wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) sprzyja replikacji wirusa [28, 29]. Potencjał terapeutyczny miR-122 został rozpoznany przez firmy farmaceutyczne Santaris i Regulus, które prowadzą obecnie prace nad rozwojem metod leczenia HCV opartych na inhibicji tego miRNA [30]. Dokładniejsze poznanie znaczenia miRNA w chorobach wirusowych z pewnością zaowocuje wkrótce rozwojem kolejnych metod leczenia opartych na tych cząsteczkach.

5. Strategie terapeutycznej modulacji miRNA

5.1 Inhibicja działania miRNA

Dojrzałe miRNA są krótkimi łańcuchami kwasu rybonukleinowego. Ich charakter biochemiczny determinuje zatem hybrydyzację z komplementarnymi cząsteczkami na zasadzie oddziaływań typu Watson'a-Crick'a jako najkorzystniejszy sposób zahamowania miRNA. ASOs wydają się najszybszą możliwą do zastosowania metodą terapeutycznej inhibicji miRNA. Specyficzne ASOs skierowane przeciwko cząsteczkom miRNA, określane jako AMOs (anti-miRNA ASOs), były stosowane przez wiele grup do obniżania aktywności miRNA w badaniach na kulturach komórkowych. Wykazano skuteczność oligonukleotydów z modyfikacjami cukru w pozycji 2' (szczególnie 2'-O-metylo (2'-OMe), 2'-O-metoksyetylo (2'-MOE), 2'-fluoro (2'-F) i mostka tlenowego między pozycjami 2' i 4' (ang. *locked nucleic acids*, *LNA*), jak również podstawienie atomu tlenu w fosforanie szkieletu fosfocukrowego atomem siarki [31, 32].

Podwyższanie powinowactwa AMOs do miRNA wydawałoby się pozytywnie wpływać na aktywność tych molekuł, jednakże dokładniejsze zbadanie tego związku nie wykazało silnej korelacji między powinowactwem, a rzeczywistą skutecznością AMOs [33]. Wskazuje to na znaczenie również innych, nie do końca jeszcze dobrze zdefiniowanych, parametrów. Sugerowano, że AMOs mogą obniżać poziom dojrzałego miRNA, jednakże fakt zachodzenia tej degradacji jest do tej pory kontrowersyjny [31, 32]. Pomimo doniesień o efektywności systemowego podania samych AMOs w roztworze soli fizjologicznej [34], próbuje się poprawiać biodystrybucję oligonukleotydów przez zamykanie w liposomach oraz sprzęganie z małowcząsteczkowymi ligandami np. cholesterolem [17]. O ile sprzęganie wydaje się być atrakcyjną ścieżką w kierunku tworzenia eksperymentalnych terapii bazujących na AMOs, to kompleksy lipidowe zawierające AMOs wykazują ograniczenia związane z toksycznością, kosztami oraz ograniczoną dystrybucją *in vivo*.

5.2 Wpływ na biogenezę miRNA

Globalne ograniczenie poziomu wszystkich miRNA może być osiągnięte przez zahamowanie procesu dojrzewania tych cząsteczek przez inhibicję enzymów Drosha, Dicer lub innych komponentów szlaku. Spodziewane są jednak liczne pleiotropowe efekty takiego podejścia. Ponadto, dość łagodne efekty obniżenia aktywności składników szlaku biogenezy miRNA sugerują, iż cząsteczki te charakteryzują się dość dużą stabilnością i długim czasem życia w komórce, co ogranicza możliwość zastosowania takiej strategii w krótkoterminowej terapeutycznej modulacji poziomu miRNA [31].

5.3 Metody suplementacji

W przypadku wielu schorzeń, w szczególności nowotworów, obniżenie poziomu pewnych miRNA przyczynia się istotnie do rozwoju objawów patologicznych. Stąd, dostarczanie molekuł mogących pełnić w komórkach funkcje brakujących cząsteczek miRNA wydaje się mieć potencjał terapeutyczny. Najbardziej realne wydaje się na chwilę obecną zastosowanie w tym celu cząsteczek analogicznych do naturalnych produktów cięcia przez Dicer i zbliżonych strukturą do cząsteczek siRNA. Zastosowanie takich cząsteczek napotyka jednak te same trudności, jak w przypadku terapeutycznych siRNA, przede wszystkim stabilność i dostarczenie do różnych typów tkanek. Niezbędne wydają się modyfikacje chemiczne stosowanych kwasów nukleinowych, tak aby poprawić stabilność w płynach ustrojowych głównie przez zabezpieczenie przed degradacją przez nukleazy, a także zapobiec szybkiemu usuwaniu z krwioobiegu przez filtrację w nerkach. Ochronę przed nukleolitycznym trawieniem mogą zapewnić liczne modyfikacje pozycji 2' cukru (2'-OMe, 2'-MOE, 2'-F, LNA). Podstawienie części atomów tlenu siarką w szkielecie fosfocukrowym sprzyja wiązaniu przez białka osocza i opóźnia usuwanie przez nerki [31]. Poprawa pobierania preparatów możliwa jest do osiągnięcia przez sprzężanie z resztami takimi jak cząsteczki cholesterolu [17]. Skutecznym podejściem może być także lokalne podanie terapeutycznych kwasów nukleinowych. Podawanie wziewne wykazało efekt terapeutyczny w leczeniu infekcji wirusowych górnego układu oddechowego [31].

Pierwsze próby kliniczne zostały już przeprowadzone dla doocznego podawania siRNA przeciwko receptorowi dla VEGF w leczeniu zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem (ang. *Age-related Macular Degeneration*, AMD) [35]. Niedawne badania wykazały, iż w tym przypadku siRNA działają przez aktywację receptora Toll-podobnego 3 (TLR3, Toll-like receptor 3). Mechanizm ten jest niezależny od sekwencji siRNA, charakterystyczny dla tej klasy cząsteczek, a jego występowanie zależy od długości i chemicznej struktury oligonukleotydu [36].

5.4 Ekspresja miRNA z wektorów wirusowych

Odminnym podejściem do dostarczania terapeutycznych cząsteczek miRNA do organizmu jest umieszczenie kodujących ich sekwencji w obrębie zmodyfikowanego genomu wirusowego służącego jako wektor. Zwykle polega to na wklonowaniu odpowiedniej kasety ekspresyjnej zawierającej sekwencję kodującą krótką cząsteczkę RNA o strukturze spinki do włosów (ang. *short hairpin RNA*, shRNA) za promotorem dla polimerazy RNA II lub III. shRNA jest następnie cięte przez Dicer i ulega załadunkowi do RISC. Niewątpliwymi korzyściami płynącymi z takiej strategii jest szansa uzyskania bardziej stabilnej i długotrwałej ekspresji bez konieczności wielokrotnego podawania preparatów leczniczych miRNA, a także możliwość ekspresji wielu cząsteczek miRNA jednocześnie [31,37]. Przydatność zmodyfikowanych retrowirusów, adenowirusów i wirusów związanych z adenowirusami (ang. *Adeno-associated Viruses*, AAV) do dostarczania transgenów do komórek wielu tkanek została potwierdzona w licznych badaniach [38]. Niestety wciąż podejście to napotyka ograniczenia związane z ryzykiem mutagenyzy inercyjnej w przypadku retrowirusów, odpowiedzią immunologiczną przeciwko adenowirusom oraz ograniczoną infekcją niektórych typów tkanek. W konstrukcji wektorów tych typów możliwe jest wykorzystanie specyficznej dla danego typu komórek bądź tkanki ekspresji pewnych miRNA w celu modyfikacji naturalnego tropizmu wirusów. Przykładowo dodanie sekwencji komplementarnej dla specyficznego dla hepatocytów miR-122 do genu E1A onkolitycznego wektora adenowirusowego umożliwia redukcję replikacji wirusa w tych komórkach oraz hepatotoksyczności związanej z podaniem wektora, przy jednoczesnym zachowaniu zdolności do normalnej replikacji w pozostałych typach komórek [39]. W celu uzyskania myszy z obniżoną ekspresją niektórych genów użyto natomiast lentiwirusów niosących sekwencje dla określonych miRNA do infekcji embrionalnych komórek macierzystych [40]. Wektory lentiwirusowe zapewniają zwykle stabilniejszą ekspresję transgenicznego miRNA, co związane jest z integracją do genomu zainfekowanych komórek. Badania Grimm'a i współpracowników [41] zwróciły uwagę także na ryzyko saturacji szlaku RNAi przez zastosowanie zbyt silnych promotorów dla ulegających ekspresji cząsteczek shRNA. Eksportyna 5, będąca czynnikiem limitującym eksport pre-miRNA z jądra do cytoplazmy wydaje się mieć znaczenie w mechanizmie hepatotoksyczności indukowanej podaniem wektorów z shRNA pod silnymi promotorami. Stąd konieczność starannej optymalizacji konstrukcji wektorów do terapeutycznego uzupełniania niedoborów ekspresji niektórych miRNA.

6. Podsumowanie

Niedawne odkrycie znaczenia miRNA w regulacji ekspresji genów przyniosło falę zainteresowania i intensywnych badań mających na celu poznanie ich roli zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Uzyskane wyniki dają nadzieje na możliwość opracowania licznych zastosowań terapeutycznych tych cząsteczek szczególnie w dziedzinie terapii genowej. Wciąż jednak pozostało wiele do odkrycia w kwestii dokładnego mechanizmu działania miRNA, jak i funkcji konkretnych z nich. Z pewnością największy potencjał zdaje się tkwić w zdolności pojedynczego miRNA do regulacji ekspresji wielu powiązanych genów, co mogłoby prowadzić do regulacji całych szlaków sygnałowych, czy metabolicznych przy pomocy modulacji jednej lub kilku cząsteczek np. dostarczonych przez podanie w jednym wektorze wirusowym. Ponadto cząsteczki te są niewielkiej długości, co umożliwia modulację krótkimi oligonukleotydami, bądź inkorporację do wektorów używanych w terapii genowej. Wpływ na wiele docelowych mRNA stanowić może jednak również poważne utrudnienie w rozwoju leków opartych na miRNA ze względu na spodziewane efekty uboczne i jest przyczyną skupienia uwagi przemysłu farmaceutycznego głównie na cząsteczkach siRNA [42]. Mimo to, należy spodziewać się, iż optymalizacja kwestii dostarczania, wydajności, stabilności i toksyczności zaowocuje w najbliższych latach licznymi klinicznymi zastosowaniami miRNA.

7. Literatura

1. Fire A et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391(6669): 806–11.
2. Grünweller A et al. RNA Interference as A Gene-Specific Approach for Molecular Medicine. *Current Medicinal Chemistry* 2005, 12: 3143-3161.
3. Sledz CA et al. RNA interference in biology and disease. *Blood* 2005, 106: 787-794.
4. Lu PY et al. Harnessing in vivo siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. *Drug Discovery Today* 2006, 11(1-2):67-73.
5. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32:D109-111.
6. Lewis BP et al. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005, 120:15-20.
7. Williams AE. Functional aspects of animal microRNAs. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008, 65:545-562.
8. Erson AE et al. MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet* 2008, 74:296-306.
9. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004, 116:281-297.
10. Zhang C. MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. *Clin Sci (Lond)* 2008, 114(12):699-706.

11. <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/mirbase/sequences/CURRENT/README>.
12. Zhang C. MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. *Physiol Genomics* 2008, 33:139-147.
13. Sassen S et al. MicroRNA – implications for cancer. *Virchows Arch* 2008, 452:1-10.
14. Lu J et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005, 435(7043):834-8.
15. Silvestri P et al. MicroRNAs and Ischemic Heart Disease: Towards a Better Comprehension of Pathogenesis, New Diagnostic Tools and New Therapeutic Targets. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2009, 4(2):109-18.
16. Bernstein E et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet.* 2003, 35(3):215-7.
17. Krützfeldt J et al. Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature* 2005, 438(7068):685-9.
18. Calin GA et al. Frequent deletions and down-regulation of miRNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:15524-15529.
19. Cho WCS. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Molecular Cancer* 2007, 6:60.
20. Woods K et al. Direct regulation of an oncogenic microRNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem* 2007, 282:2130-2134.
21. Mayr C et al. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 2007, 315:1576-1579.
22. Kumar MS et al. Impaired miRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007, 39:673-689.
23. Ubich C et al. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovascular Research* 2008, 79:581-588.
24. Zhao Y et al. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005, 436:215-220.
25. Poliseno L et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 2006, 108:3068-3071.
26. Scalbert E et al. Implications of microRNAs in the cardiovascular system. *Curr Opin Pharmacol.* 2008, 8(2):181-8.
27. Xu P et al. The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol.* 2003, 13(9):790-5.
28. Sall A et al. MicroRNAs-Based Therapeutic Strategy for Virally Induced Diseases. *Curr Drug Discov Technol.* 2008, 5(1):49-58.
29. Cullen BR. Viruses and microRNAs. *Nat Genet.* 2006, 38 Suppl:S25-30.
30. <http://regulusrx.com/> , <http://www.santaris.com/Default.aspx> .
31. Esau CC et al. Therapeutic potential for microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007, 59(2-3):101-14.
32. Horwich MD et al. Design and Delivery of Antisense Oligonucleotides to Block microRNA Function in Cultured Drosophila and Human Cells. *Nat Protoc.* 2008, 3(10):1537-49
33. Davis S et al. Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34(8):2294-304.
34. Elmén J et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature.* 2008, 452(7189):896–899.
35. Shen J et al. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther.* 2006, 13:225–234.
36. Kleinman ME et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 2008, 452(7187):591-7.

37. Snyder LL et al. RNA polymerase III can drive polycistronic expression of functional interfering RNAs designed to resemble microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2009
38. Kay MA et al. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med.* 2001, 7(1):33-40.
39. Ylösmäki E et al. Generation of a Conditionally Replicating Adenovirus Based on Targeted Destruction of E1A mRNA by a Cell Type-Specific MicroRNA. *Journal of Virology* 2008, 82:11009–11015.
40. Robinson DA et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet.* 2003, 33:401–406.
41. Grimm D et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature.* 2006, 441:537–41.
42. Mack GS. MicroRNA gets down to business. *Nat Biotechnol.* 2007, 25(6):631-8.
- .

WYKORZYSTANIE WEKTORÓW AAV W TERAPII GENOWEJ. PRÓBY KLINICZNE.

1. Wstęp

Terapia genowa jest prężnie rozwijającą się metodą leczenia, w której wykorzystuje się możliwość dotarcia do podstawowej przyczyny wielu chorób, czyli niewłaściwie funkcjonującej informacji genetycznej zapisanej w DNA. Stosując kwasy nukleinowe zamiast leków, można zarówno modyfikować ekspresję indywidualnych genów jak i naprawiać geny wadliwe, co daje szansę na stworzenie skutecznych metod leczenia m.in. chorób dziedzicznych, sercowo-naczyniowych, nowotworów, chorób zakaźnych i wielu innych. Kluczowym czynnikiem decydującym w znacznej mierze o skuteczności takiego podejścia jest sposób wprowadzenia terapeutycznej sekwencji do komórek. Spośród różnych możliwości, coraz większą uwagę poświęca się wektorom opartym na wirusach AAV (ang. *adeno-associated virus*). Dzięki swoim właściwościom, pozwalającym m.in. na uzyskanie wysokiej i długotrwałej ekspresji wprowadzanego genu (transgenu) oraz bardzo niskiemu ryzyku przypadkowego wbudowania materiału genetycznego do genomu gospodarza, są one wykorzystywane w wielu badaniach podstawowych, które w przypadku kilkunastu chorób pozwoliły na rozpoczęcie prób klinicznych.

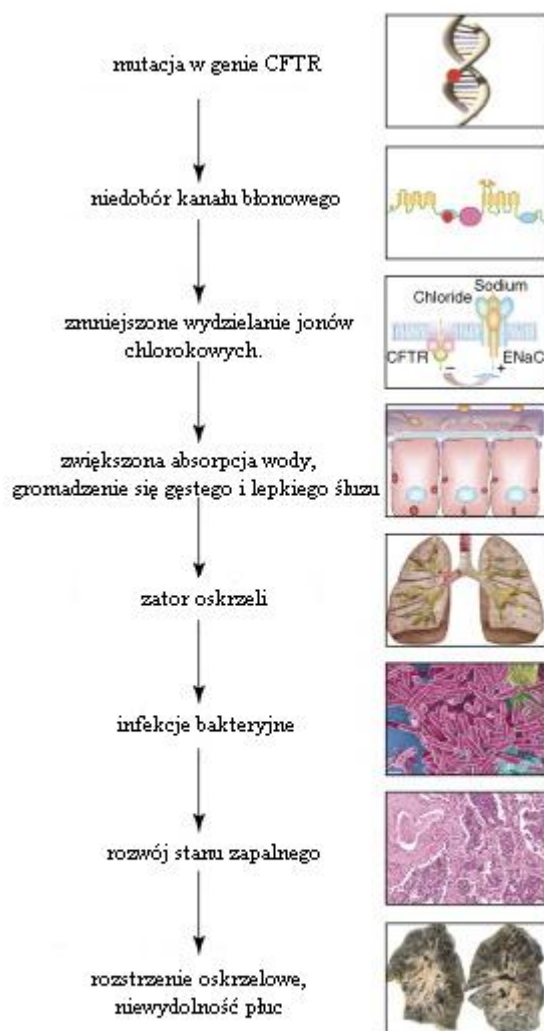
2. Wykorzystanie wektorów AAV w terapii genowej

Pierwsza publikacja, w której wykorzystano AAV jako wektor wprowadzający DNA do komórek ssących ukazała się w 1984 roku [1, 2], niemniej od tego czasu notuje się ciągły wzrost publikacji dotyczących tego tematu. Największa liczba prac dotychczas opublikowanych dotyczy badań przedklinicznych, a następnie badań nad konstrukcją, produkcją i funkcjonowaniem wektorów AAV. Ze względu m.in. na czas trwania prób klinicznych, publikacje przedstawiające ich przebieg i wyniki zaczynają się dopiero pokazywać. Poza tym, coraz mniej prac jest poświęconych doświadczeniom *in vitro*, a coraz więcej podejściu *in vivo* i próbom przedklinicznym, co stanowi logiczny rozwój przeprowadzanych eksperymentów.

Najwięcej chorób – 32 %, dla których próbuje się zastosować terapię genową z wykorzystaniem wektorów AAV stanowią choroby dziedziczne. Na drugim miejscu znajdują się nowotwory – 19 %, następnie schorzenia neurologiczne – 14 %, choroby związane z oczami – 11 %, choroby sercowo-naczyniowe – 10 %, inne choroby chroniczne – 5 % i inne – 9 %. W 2004 odnotowano, że wśród chorób dziedzicznych, hemofilia B jest głównym celem prób zastosowania terapii genowej przy użyciu wektorów AAV. Następne w kolejności są: dystrofia mięśniowa Duchenne'a, lizosomalne choroby spichrzeniowe oraz mukowiscydoza. Spośród 1283 badań klinicznych z wykorzystaniem terapii genowej, które otrzymały zgodę na przeprowadzenie między 1989 a 2007 rokiem tylko 4 % (47) dotyczy zastosowania wektorów opartych na AAV. Większość z nich – 66 %, było w fazie pierwszej, 17 % między pierwszą a drugą, 6 % w fazie drugiej i 11 % w trzeciej. Pierwsza próba kliniczna otrzymała zgodę w roku 1994, jednak większość rozpoczęto w latach 2004-2006. 53 % z nich dotyczy chorób wywołanych mutacją w jednym genie, natomiast 23 % chorób nowotworowych. Nie odzwierciedla to ogólnej tendencji badań nad zastosowaniem terapii genowej, w której najwięcej prób klinicznych wykonuje się nad nowotworami – 67 %, zaburzeniami sercowo-naczyniowymi – 9,1 % oraz na trzecim miejscu chorobami wywołanymi mutacjami w jednym genie – 8,4 %. Pierwsze wyniki badań klinicznych z wykorzystaniem wektorów AAV opublikowano w 1999 roku i dotyczyły one leczenia mukowiscydozy, która jest zarazem najczęściej leczoną chorobą za pomocą tych wektorów [1].

3. Mukowiscydoza

Mukowiscydoza jest jedną częściej występujących, recesywnych chorób o podłożu genetycznym, pojawiającą się na jedno z 2500 urodzeń. Dziedziczona jest na sposób autosomalny recesywny, a powoduje ją mutacja w genie *CFTR*, który odpowiada za syntezę chlorkowego kanału błonowego. Ulega on ekspresji w komórkach nabłonkowych dróg oddechowych, trzustki, gruczołów ślinowych i potowych, gdzie pomaga regulować wewnątrzkomórkowe stężenie chloru. Zaburzenie jego funkcji powoduje nagromadzanie się gęstego i lepkiego śluzu w płucach i przewodzie pokarmowym, co powoduje zahamowanie normalnej obrony immunologicznej płuc, które stają się miejscem częstych infekcji, chronicznego zapalenia oraz zablokowania (ryc. 1). W miarę rozwoju choroby dochodzi do ograniczania funkcji układu oddechowego, co ostatecznie kończy się śmiercią chorego zazwyczaj w drugiej lub trzeciej dekadzie życia [2]. Do tej pory opisano wiele mutacji powodujących to



Rysunek 1. Patomechanizm powstawania mukowiscydozy [zmodyfikowano za 9]

schorzenie, a najczęstsza z nich, odpowiedzialna za blisko 70 % przypadków polega na delecji trzech nukleotydów, powodując usunięcie z sekwencji białka fenyloalaniny. Oznacza się ją $\Delta F508$ i determinuje ona najprawdopodobniej ciężki przebieg tej choroby. Ponieważ mutacja zachodzi w jednym genie, a poziom jego ekspresji nie musi być wysoki ani ściśle kontrolowany do uzyskania poprawy zdrowia, mukowiscydoza stała się jednym z pierwszych celów terapii genowej. Głównymi problemami przy jej zastosowaniu stała się transdukcja odpowiednich komórek w układzie oddechowym oraz, biorąc pod uwagę wykorzystanie wektorów AAV, długość sekwencji CFTR – 4,4 kpz, która odpowiada granicom ich pojemności [3]. Aby rozwiązać drugą z wymienionych przeszkód firma Targeted Genetics skonstruowała wektor tgAAVCF, zawierający gen *CFTR* pozbawiony promotora, którego transkrypcja miała być

przeprowadzana dzięki funkcjom promotorowym sekwencji ITR AAV2 [4-7]. W 2002 roku opublikowano wyniki drugiej fazy prób klinicznych, w której opisany wektor podano 23 pacjentom. Wyniki doświadczenia pokazały, że terapia genowa z zastosowaniem tgAAVCF w leczeniu mukowiscydozy jest dobrze tolerowana przez organizm. Nie zaobserwowano poważnych skutków ubocznych, zwiększonego stężenia przeciwciał neutralizujących AAV2 oraz oznak procesu zapalnego związanego z podaniem wektorów. Niemniej uzyskane efekty terapeutyczne nie osiągnęły

statystycznie znaczącej różnicy między grupą pacjentów, której podano tgAAVCF a grupą kontrolną [8].

4. Hemofilia B

Hemofilia B jest dziedziczną chorobą sprzężoną z chromosomem X, spowodowaną mutacjami w genie kodującym czynnik IX kaskady krzepnięcia krwi. Osoby cierpiące na hemofilię charakteryzują się więc zaburzeniami w tym procesie, co może doprowadzić m.in. do uszkodzeń stawów i mięśni z powodu niekontrolowanych krwawień wewnętrznych [9]. Leczenie tej choroby polega na suplementacji czynnika IX, niemniej wykazuje ona szereg cech sprawiających, że jest dobrym kandydatem dla terapii genowej. Przede wszystkim jedynie niewielka ilość białka – 1,5-5 % normalnego poziomu w surowicy – wystarcza do uzyskania terapeutycznego efektu [10], przy czym nie jest wymagana ścisła kontrola jego ekspresji, zarówno pod względem ilości, jak i stanów fizjologicznych, w których miałyby do niej dochodzić [10]. Co więcej, sekwencja cDNA kodująca czynnik IX jest relatywnie krótka – ok. 1,4 kpz, więc doskonale pasuje do wektorów AAV, a białko to ulega sekrecji, więc można transdukować komórki różnych organów w celu uzyskania jego ekspresji i wydzielania do układu krwionośnego [11-13].

W związku z tym 1999 roku firma Avigen przy współpracy z Centrum Medycznym Uniwersytetu w Stanford rozpoczęła fazę I/II badań klinicznych nad wprowadzaniem i ekspresją czynnika IX podawanego do wątroby lub domięśniowo za pomocą wektorów opartych na AAV2. W grudniu 2000 roku zostały zaprezentowane wstępne wyniki doświadczeń nad iniekcją domięśniową. U sześciu z siedmiu pacjentów uzyskano transdukcję komórek mięśniowych, przy czym u dwojga z nich poziom czynnika IX we krwi wzrósł do poziomu przekraczającego lub równego 1 % normy. Dzięki temu u tych pacjentów można było znacznie zredukować poziom suplementowanego białka przez ponad półtora roku [3]. Następnie opublikowano dodatkowe dane dotyczące fazy I/II otwartej próby klinicznej na ośmiu pacjentach z ciężką postacią hemofilii B, która miała na celu ustalenie odpowiedniej, terapeutycznej dawki wektorów AAV. Badania pokazały, że wektory te są dobrze tolerowane przez pacjentów, niemniej nie udało się ustalić ich efektywnej ilości. Oznacza to, że pomimo zaobserwowanej transdukcji komórek mięśniowych i ekspresji czynnika IX, jego poziom nie był wystarczający, by uzyskać długotrwały efekt terapeutyczny [14].

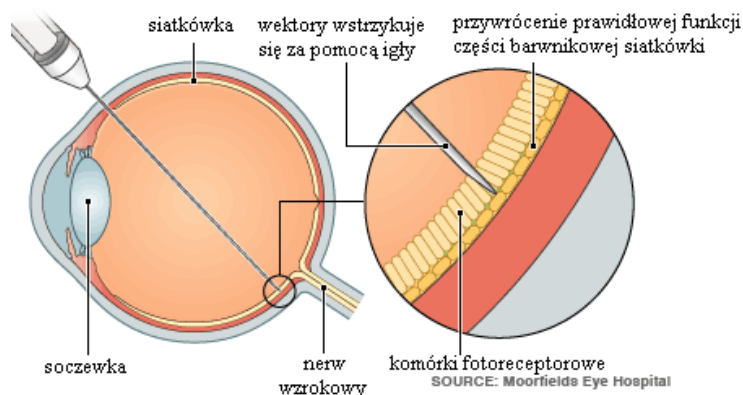
Pierwszy pacjent, któremu wprowadzano transgen do wątroby, otrzymał wektor AAV niosący czynnik IX przez podanie do tętnicy wątrobowej. Badanie zostało jednak

przerwane w związku z wykryciem wektorów w nasieniu [10]. Wstępne wyniki z tej próby klinicznej zaprezentowano w lipcu 2003 roku. W ciągu dwóch lat, sześciu pacjentów otrzymało wektor w różnych dawkach. Osoba, która otrzymała największą ilość terapeutycznego transgenu osiągnęła poziom krążącego czynnika IX w wysokości 5-12 % normy przez 5 tygodni, w ciągu których nie potrzebowała suplementacji tym białkiem. Niemniej, w ciągu następnego tygodnia ilość ta spadła do 2,7 %. Dodatkowo zaobserwowano krótkotrwałe podniesienie poziomu transaminaz, któremu nie towarzyszyły istotne klinicznie zaburzenia funkcji wątroby, co świadczy o powstaniu komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Co więcej, rozwój tej odpowiedzi można było skorelować z redukcją ekspresji transgenu w hepatocytach.

Wyniki badań pokazały, że wprowadzanie wektorów AAV do wątroby jest bardziej wydajne niż do komórek mięśniowych, ale w obu przypadkach stężenie czynnika IX znacząco spada po czterech do ośmiu tygodni od podania [3]. Ponieważ liczba pacjentów w obu próbach była niewielka, nie można na podstawie tych badań wysuwać ogólnych wniosków, niemniej potwierdziły one, że stan zdrowia przynajmniej części pacjentów uległ czasowej poprawie po zastosowaniu terapii genowej. Niemniej, należy rozważyć możliwość zastosowania czasowej immunosupresji w trakcie podawania wektorów, aby otrzymać maksymalną wydajność produkcji terapeutycznych czynników [10, 15].

5. Ślepota wrodzona Lebera

Kolejnym narządem, w którym bada się możliwość terapeutycznego zastosowania wektorów AAV jest oko. Narząd ten jest bardzo dobrym kandydatem dla terapii genowej, ponieważ można uzyskać w nim lokalne, stosunkowo/względnie wysokie stężenie wektorów przy niewielkiej ich dawce i ograniczonej odpowiedzi immunologicznej organizmu. W dotychczasowych badaniach pokazano wydajną transdukcję komórek RPE (ang. *retinal pigment epithelium*) i fotoreceptorów po iniekcji wektorów AAV pod siatkówkę (ryc. 2) na wielu modelach zwierzęcych i przy wykorzystaniu różnych serotypów [16-18]. Jedną z chorób genetycznych dotyczących oka jest ślepota wrodzona Lebera, która stanowi 5 % dziedzicznych zaburzeń siatkówki. Występuje z częstotliwością trzech na 100000 urodzeń i powoduje niemal całkowitą ślepotę już w okresie dzieciństwa, a jak dotąd nie stworzono skutecznej terapii przeciwko temu schorzeniu [19-22]. Mutacje powodujące pojawienie się choroby zostały zlokalizowane w różnych genach, a jedną z częstszych form (12 % wszystkich przypadków) stanowi typ drugi ślepoty wrodzonej Lebera. Spowodowana jest ona



Rysunek 2. Oko jako potencjalne miejsce zastosowania wektorów AAV.

uniemożliwia regenerację rodopsyny i powoduje odkładanie estrów trans-retinolu w ciałkach inkluzyjnych w obrębie komórek. Efektem tych nieprawidłowości jest zaś degeneracja czopków i pręcików, co z kolei prowadzi do ślepoty [21]. Na podstawie obiecujących wyników badań na zwierzętach rozpoczęto w 2007 roku pierwszą próbę kliniczną wyleczenia typu drugiego ślepoty wrodzonej Lebera, wykorzystującą terapię genową opartą o wektory AAV. Dotychczasowe dane pokazują, że taka terapia jest bezpieczna i nie powoduje skutków ubocznych. U wszystkich pacjentów funkcje wizualne nie uległy pogorszeniu, a u jednego zaobserwowano znaczną poprawę widzenia w ciemności. Zespół przeprowadzający tą próbę kliniczną rozpoczął już badanie wykorzystywanej techniki u młodszych pacjentów, u których ma nadzieje uzyskać jeszcze lepsze wyniki [23].

6. Reumatoidalne zapalenie stawów

Reumatoidalne zapalenie stawów to złożona choroba ustrojowa o podłożu autoimmunologicznym, która może obejmować wiele tkanek i narządów, ale atakuje głównie stawy. Charakterystyczną jej cechą jest ciągły stan zapalny błony maziowej, prowadzący często do zniszczenia chrząstki stawowej. Około 1 % populacji ludzkiej jest dotknięty tym schorzeniem, przy czym kobiety trzy razy częściej niż mężczyźni [24]. Obecne podejście terapeutyczne przewiduje jak najwcześniejsze rozpoczęcie podawania środków modyfikujących przebieg choroby, tak aby zapobiec uszkodzeniom stawów, a ponieważ nieprawidłowo funkcjonujący układ immunologiczny jest główną jej przyczyną, stosowane leki mają działanie immunosupresyjne. Niemniej, próbuje się również wykorzystać czynniki biologiczne blokujące molekuly zaangażowane w

zmianami w genie *RPE65*, które koduje mikrosomalne białko uczestniczące w regeneracji 11-cis retinolu z retinolu posiadającego wszystkie wiązania podwójne w konformacji trans. Ulega ono ekspresji wyłącznie w komórkach RPE, a utrata jego aktywności

patogenezę reumatoidalnego zapalenia stawów. Należą do nich białka oddziałujące m.in. z cząsteczkami CD-20 (rituximab), CTLA-4 (abatacept), interleukiną 6 (tocilizumab), interleukiną 1 (anakinra) oraz czynnikiem nekrozy nowotworów typu α (etanercept, infliximab, adalimumab). Ostatnia z wymienionych cytokin, TNF α , wydaje się odgrywać ważną rolę w rozwoju choroby, ponieważ jej neutralizacja powoduje silną, pozytywną odpowiedź pacjentów. Z tego względu została ona wybrana jako cel terapii genowej z wykorzystaniem wektorów AAV. Firma Targeted Genetics skonstruowała wektor o nazwie tgAAC94, przenoszący sekwencję fragmentu Fc immunoglobuliny IgG1 połączonego z rozpuszczalnym receptorem TNF α , a następnie wykorzystała go do przeprowadzenia prób klinicznych. W 2005 roku zakończono fazę I, oceniającą bezpieczeństwo wewnątrzstawowej iniekcji tgAAC94 u 11 pacjentów, którzy nie otrzymywali równocześnie innych antagonistów TNF α . W trakcie badania określono odpowiednią dawkę wektorów wirusowych oraz nie stwierdzono poważnych skutków ubocznych ich podawania. W następnej fazie (I/II) wzięło udział 127 osób cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów, artropatię łuszczykową oraz zesztwniające zapalenie stawów kręgosłupa. Dotychczasowe wyniki pokazały tendencję w kierunku trwałej poprawy w obszarze tkliwości uciskowej oraz opuchnięcia przez przynajmniej 12 tygodni u pacjentów otrzymujących terapeutyczne wektory w porównaniu z grupą placebo. Niestety, jedna z osób, której podawano wyższą dawkę tgAAC94, zmarła, co spowodowało wstrzymanie próby przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA). Jak się jednak okazało, śmierć została spowodowana rozproszoną histoplazmozą z następującymi powikłaniami oraz niewydolnością wielu organów. Biorąc pod uwagę naturę tej choroby, jest bardzo prawdopodobne, że została ona wywołana supresją układu immunologicznego, będącą efektem równocześnie przyjmowanych przez pacjentkę leków na reumatoidalne zapalenie stawów, takich jak adalimumab, metotreksat i prednizon. W związku z tym stwierdzono, że wektory AAV nie miały wpływu na zaistniałą sytuację, a FDA pozwoliła na dalszą kontynuację tej fazy badań [15].

7. Choroby centralnego układu nerwowego

Choroba Canavan'a (zwyrodnienie gąbczaste układu nerwowego) to rzadkie, dziedziczne schorzenie spowodowane niedoborem N-acetyloaspartazy, którego przyczyną są mutacje w genie kodującym to białko. Najczęstszą z nich stanowi tranzycja adeniny na cytozynę, która powoduje zamianę kwasu glutaminowego na alaninę w centrum aktywnym enzymu i w rezultacie całkowitą utratę jego funkcji.

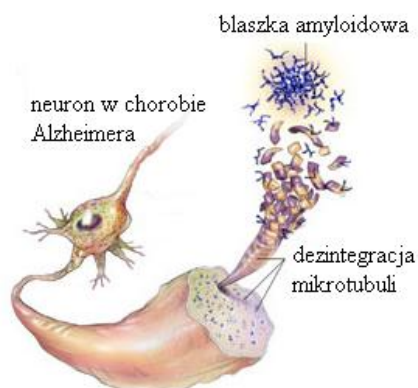
N-acetyloaspartaza ulega początkowo ekspresji w komórkach centralnego układu nerwowego, więc zaburzenia w jej funkcjonowaniu powodują akumulację N-acetyloasparaginianu, która wpływa na proces mielinizacji, skutkując gąbczastym zwyrodnieniem mózgu. Symptomy tej choroby obejmują m.in. opóźnienie rozwoju umysłowego i motorycznego, wielkogłowie, napady padaczkowe, a jak dotąd nie znaleziono dla niej skutecznej terapii. Niemniej, terapia genowa z użyciem wektorów AAV może okazać się skutecznym narzędziem w walce z tą chorobą [25-28]. Uzyskane wyniki badań przedklinicznych pozwoliły na zaprojektowanie próby klinicznej sprawdzającej efektywność podawania wektorów AAV2 przenoszących sekwencję dla N-acetyloaspartazy. Za pomocą operacji neurochirurgicznej zostały one podane do miejsc wykazujących zmiany chorobowe u 10 pacjentów. Badania pokazały, że wprowadzenie wektorów do centralnego układu nerwowego jest dobrze tolerowane, niemniej u 3 osób wykryto niski poziom odpowiedzi immunologicznej przeciwko AAV2, objawiającej się wzrostem przeciwciał neutralizujących ten serotyp w surowicy. Co ciekawe, dalsza analiza wykazała całkowitą nieobecność takich przeciwciał w płynie rdzeniowo-mózgowym oraz brak oznak zapalenia w mózgu [29].

Choroba Parkinsona jest powoli postępującą zwyrodnieniową chorobą ośrodkowego układu nerwowego, należąca do chorób układu pozapiramidowego, wywołaną zmianami zwyrodnieniowymi komórek nerwowych w istocie czarnej i innych obszarach barwnikonośnych mózgowia. Konsekwencją zaburzenia funkcji tych neuronów jest niedobór dopaminy (ok. 70-80 %) w istocie czarnej i prążkowie i przewaga neuronów glutaminergicznych, hamujących jądra wzgórza. W proces neurodegeneracyjny wciągnięte są układy: dopaminergiczny (istota czarna, podwzgórze, układ mezokortykalno-limbiczny, siatkówka) noradrenergiczny (miejsce sinawe), cholinergiczny (jądro podstawne Meynerta) i glutaminergiczny, jednak dokładne przyczyny jego rozwoju nie są znane. Niemniej, neurotroficzne czynniki wzrostu, takie jak GDNF (ang. *glial cell-derived neurotrophic factor*) i jego naturalnie występujący analog NTN (neurturin) okazały się poprawiać funkcję oraz chronić przed zniszczeniem neurony dopaminergiczne [15]. W związku z tym firma Ceregene zainicjowała w 2005 roku pierwszą fazę prób klinicznych z wykorzystaniem wektora AAV2-NTN, nazwanego CERE-120. Badanie miało na celu sprawdzenie bezpieczeństwa oraz tolerancji na jego podanie do istoty czarnej oraz prążkowie u 12 osób cierpiących na chorobę Parkinsona, które podzielono na dwie grupy w zależności od ilości wektorów. Ocena wpływu terapii trwała od 9 do 12 miesięcy dla pacjentów otrzymujących niższą dawkę oraz 4 do 8 miesięcy dla pacjentów otrzymujących dawkę wyższą. W obu

przypadkach zauważono poprawę w skali UPDRS (ang. *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*) i jednocześnie nie stwierdzono poważnych skutków ubocznych ani znaczących zmian m.in. w badaniach neuropsychiatrycznych oraz neurologicznych. Faza II prób klinicznych obejmująca 58 pacjentów z zaawansowaną chorobą potwierdziła bezpieczeństwo stosowania CERE-120, jednak nie zauważono znaczących różnic między osobami otrzymującymi terapeutyczne wektory a grupą kontrolną, której podano placebo [15].

Alternatywnym podejściem w terapii genowej choroby Parkinsona jest podanie wektorów AAV przenoszących sekwencję dwóch izoform dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD 65 i GAD 67) do jądra podwzgórza. Enzymy te katalizują syntezę kwasu γ -aminomasłowego, głównego neuroprzekaźnika o działaniu hamującym w mózgu. U pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona, aktywność jądra podwzgórza jest zwiększona, przede wszystkim z powodu zmniejszonego dostarczania kwasu γ -aminomasłowego z gałki bladej [30, 31]. Taką strategię zastosowano w fazie I prób klinicznych z udziałem 12 pacjentów poddawanych operacyjnej implantacji elektrod stymulujących. W badaniu wykorzystano trzy różne dawki wektorów AAV2-GAD podanych jednostronnie do jądra podwzgórza i nie zaobserwowano poważnych efektów ubocznych tej procedury. Co więcej, w części ciała związanej z miejscem wstrzyknięcia AAV2-GAD odnotowano znaczącą poprawę motoryczną w skali UPDRS przez okres od 3 miesięcy do 1 roku. Dodatkowo, pozytronowa emisyjna tomografia komputerowa pokazała istotną redukcję metabolizmu w obszarze wzgórza ograniczonego do półkuli mózgowej objętej badaniem [32, 33]. Kolejne badanie kliniczne będące w fazie I wykorzystuje wektory AAV przenoszące sekwencję ludzkiej dekarboksylazy L-aminokwasów aromatycznych (AADC). Strategia ta ma na celu zwiększenie konwersji powszechnie wykorzystywanego leku o nazwie Levodopa, będącego biosyntetycznym prekursorem dopaminy, z udziałem wyżej wymienionego enzymu. Takie podejście powinno skutkować wzrostem efektywności leku i jednocześnie pozwolić na zmniejszenie jego dawki [15].

Terapie genowe z wykorzystaniem wektorów AAV próbuje się również wykorzystać do leczenia choroby Alzheimer. Jest to degeneracyjna choroba ośrodkowego



Rysunek 3. Zmiany dotyczące komórki nerwowe w chorobie Alzheimer

układu nerwowego, charakteryzująca się występowaniem blaszek amyloidowych zbudowanych z β -amyloidu oraz nadmierną agregacją białka tau wewnątrz komórek nerwowych mózgu (ryc.3). Prowadzi ona m.in. do zaburzeń pamięci, funkcji poznawczych oraz osobowości i zachowania. Na tym polu terapia genowa była skupiona głównie na dostarczeniu czynnika wzrostu nerwów (NGF), mającego bronić odpowiednią populację neuronów przed degeneracją związaną z wiekiem oraz zwiększyć przeżycie neuronów cholinergicznym [15]. Taką strategię przyjęła też wspomniana wcześniej firma Ceregene, która rozpoczęła fazę I prób klinicznych z wykorzystaniem wektorów AAV2-NGF. Wyniki uzyskane od sześciu pacjentów pokazały, że terapia była bezpieczna i dobrze tolerowana, w związku z czym planowane jest przeprowadzenie fazy II [15, 34].

Kolejną chorobą ośrodkowego układu nerwowego do której leczenia próbuje się wykorzystać wektory AAV jest postać późnoniemowlęca lizosomalnej choroby spichrzeniowej z grupy ceroidolipofuscynoz neuronalnych, spowodowanej mutacjami w genie *CLN2* kodującym tripeptydylo-peptydazę I. Ujawnia się ona w późnym niemowlęctwie i powoduje napady padaczkowe, hipotonię mięśniową, ataksję mózdkową, upośledzenie umysłowe i postępujące zaburzenie widzenia, prowadzące do ślepoty [35]. W ramach terapii genowej testuje się wektory AAV2 przenoszące prawidłową sekwencję genu *CLN2* w celu sprawdzenia bezpieczeństwa bezpośredniego wewnątrzczaszkowego podania oraz ich skuteczności w spowalnianiu lub zatrzymaniu rozwoju choroby [36].

8. Niedobór α -1-antytrypsyny

α -1-antytrypsyna jest białkiem osocza krwi będącym inhibitorem proteinaz serynowych, którego główną funkcję stanowi inaktywacja elastazy uwalnianej w wyniku reakcji zapalnej przez granulocyty obojętnochłonne. Gdy stężenie AAT spada poniżej 40 % wartości prawidłowych może dochodzić do uszkodzenia tkanek, czego głównym skutkiem jest rozedma płuc. Opisano wiele mutacji w genie kodującym ten enzym, niektóre z nich mogą być nieszkodliwe, jednak część prowadzi do umiarkowanego lub ciężkiego niedoboru α -1-antytrypsyny we krwi, co może powodować wystąpienie objawów chorobowych [37]. Terapia genowa tego schorzenia teoretycznie powinna być skuteczna niezależnie od miejsca do którego wprowadzi się odpowiednią sekwencję DNA, ponieważ efekt terapeutyczny uzyskuje się po podniesieniu poziomu AAT w osoczu powyżej wartości progowej wynoszącej $11\mu\text{M}$ [15]. Pozytywne wyniki z badań przeprowadzonych na zwierzętach pozwoliły przeprowadzić fazę I prób klinicznych z

udziałem 12 pacjentów, wykorzystując wektory oparte na serotypie 2 wirusów AAV, przenoszących gen kodujący α -1-antytrypsynę. Terapia okazała się w miarę bezpieczna w obrębie zastosowanych dawek, nie zaobserwowano antygenowo-specyficznej odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów (wskazującej na odpowiedź komórkową układu immunologicznego), niemniej doszło do wzrostu odpowiedzi humoralnej przeciwko białkom kapsydu wektorów AAV2 [38]. Obecnie przeprowadza się również fazę I prób klinicznych z wykorzystaniem tej samej sekwencji transgenu, przenoszonej w wektorach opartych na serotypie 1 wirusów AAV. Zgodnie z niektórymi badaniami, serotyp ten pozwala na uzyskanie 500 razy większej wydajności transferu genów w porównaniu z AAV2 [39]. W badaniu brało udział 9 pacjentów podzielonych na trzy grupy o różnej dawce wektorów. U ośmiu z nich nie zaobserwowano poważnych efektów ubocznych związanych z podaniem AAV1-AAT. Podobna struktura prób klinicznych z wykorzystaniem AAV1-AAT i AAV2-AAT pozwoli na retrospektywne porównanie wyników dotyczących dawkowania wektorów oraz na sprawdzenie, czy pozytywna odpowiedź na terapię u zwierząt potwierdzi się u ludzi [15].

9. Niedobór lipaz lipoproteinowych

Terapię genową z wykorzystaniem wektorów AAV opartych na serotypie 1 próbuje się również zastosować do leczenia niedoborów lipazy lipoproteinowej (LPL), powodującej hipertriglicerydemię [40]. Holenderska firma Amsterdam Molecular Therapeutics zasponsorowała fazę I prób klinicznych, w której domięśniowo podawano pacjentom wektory AAV1-LPL. Zaprezentowane dotychczas wyniki wskazują na obniżenie u tych osób poziomu triglicerydów w osoczu nawet do trzech miesięcy, jednak u części z nich zaobserwowano łagodną odpowiedź zapalną w miejscu iniekcji, a we krwi i wydzielinach uzyskano relatywnie wysoki sygnał PCR wektorowego DNA, co koreluje ze skutkami ubocznymi występującymi na wcześniejszych etapach badań. Niemniej, dane te mogą wskazywać na pierwszy pozytywny kliniczny efekt w badaniu domięśniowego podawania wektorów AAV [15].

10. Zakończenie

Jak widać, większość dotychczasowych prób klinicznych pokazała bezpieczeństwo stosowania wektorów opartych na wirusach AAV, a w niektórych przypadkach otrzymano również terapeutyczny efekt. Niestety nie udało się w sposób jednoznaczny pokazać, że ich zastosowanie może stać się powszechnie wykorzystywaną

metodą leczenia. Niemniej, wektory te pozostają jednymi z najbardziej obiecujących narzędzi terapii genowej. Liczne doświadczenia przedkliniczne na modelach zwierzęcych oraz szeroko prowadzone badania podstawowe dotyczące biologii wirusów AAV mogą wkrótce przyczynić się do coraz bardziej skutecznego ich wykorzystywania i do poszerzenia zakresu chorób, które w przyszłości będziemy mogli leczyć za pomocą terapii genowej.

11. Literatura

1. Coura R *et al.* The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virol J* 2007, 16 4:99
2. Hermonat PL, Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81:6466–6470.
3. Kunzelmann K *et al.* Defects in processing and trafficking of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Exp Nephrol* 2000, 8:332–342.
4. Hildinger M *et al.* Advances in AAV-mediated gene transfer for the treatment of inherited disorders. *Eur J Hum Genet* 2004, 12:263–271
5. Flotte TR *et al.* Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* 1993, 268: 3781–3790.
6. Haberman RP *et al.* Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. *J Virol* 2000, 74:8732–8739.
7. Flotte TR *et al.* Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther* 2003, 14:1079–1088.
8. Aitken ML *et al.* A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 2001, 12: 1907–1916.
9. Wagner JA *et al.* A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum Gene Ther* 2002, 13:1349–1359.
10. Amaral MD *et al.* Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends Pharmacol Sci* 2007 Jul;28(7):334-41
11. Bell B *et al.* Hemophilia: an updated review. *Pediatr Rev* 1995, 16:290–298.
12. High KA *et al.* Woodward Award. AAV-mediated gene transfer for hemophilia. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2003, 114:337–351, (discussion 351-2).
13. Herzog RW *et al.* Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther* 2001, 4:192–200.
14. Snyder RO *et al.* Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 1997, 16:270–276.
15. Auricchio A *et al.* Noninvasive gene transfer to the lung for systemic delivery of therapeutic proteins. *J Clin Invest* 2002, 110:499–504.
16. Manno CS *et al.* AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 2003, 101:2963–2972.
17. Mueller C *et al.* Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 2008, 15:858-863
18. Auricchio A Pseudotyped AAV vectors for constitutive and regulated gene expression in the

- eye. *Vision Res* 2003, 43:913–918.
19. Stopa M Gene therapy prospects in ophthalmology. *Klin Oczna* 2002, 104:289–292
20. Martin KR *et al.* Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods* 2002, 28:267–275.
21. Fazzi E *et al.* Leber's congenital amaurosis: an update. *Eur J Paediatr Neurol* 2003, 7:13–22.
22. Dejneka NS *et al.* Gene therapy and animal models for retinal disease. *Dev Ophthalmol* 2003, 37:188–198.
23. Cremers FP *et al.* Molecular genetics of Leber congenital amaurosis. *Hum Mol Genet* 2002,
24. Perrault I *et al.* Leber congenital amaurosis. *Mol Genet Metab* 1999, 68:200–208.
25. <http://www.nei.nih.gov/lca/>
26. Majithia V *et al.* Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am. J. Med.* 2007, 120(11):936–939.
27. Leone P *et al.* Global CNS gene transfer for a childhood neurogenetic enzyme deficiency: Canavan disease. *Curr Opin Mol Ther* 1999, 1:487–492.
28. Gordon N Canavan disease: a review of recent developments. *Eur J Paediatr Neurol* 2001, 5:65–69
29. Baslow MH Canavan's spongiform leukodystrophy: a clinical anatomy of a genetic metabolic CNS disease. *J Mol Neurosci* 2000, 15:61–69.
30. Matalon RM *et al.* Spongy degeneration of the brain, Canavan disease: biochemical and molecular findings. *Front Biosci* 2000, 5:D307–D311.
31. McPhee SW *et al.* Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease. *J Gene Med* 2006, 8:577–588
32. Obeso JA *et al.* Pathophysiologic basis of surgery for Parkinson's disease. *Neurology* 2000, 55:S7–S12
33. Wichmann T *et al.* Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci* 2003, 991:199–213
34. Feigin A *et al.* Modulation of metabolic brain networks after subthalamic gene therapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104:19559–19564
35. Kaplitt MG *et al.* Safety and tolerability of gene therapy with adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 2007, 369:2097–2105
36. <http://www.ceregene.com/clinical.asp>
37. Liberski P *et al.* *Neuropatologia Mossakowskiego*. Lublin: Wydawnictwo Czelej, 2005, ss. 104–105.
38. Crystal RG *et al.* Clinical protocol. Administration of replication-deficient adeno-associated virus gene transfer vector expressing the human CLN2 cDNA to the brain of children with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Gene Ther* 2004, 15:1131–1154
39. Kalsheker N *Alpha 1-antitrypsin: structure, function and molecular biology of the gene.* *Biosci. Rep.* 1989, 9(2):129–38
40. Flotte TR *et al.* Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults. *Hum Gene Ther* 2004, 15:93–128
41. Chao H *et al.* Sustained and complete phenotype correction of hemophilia B mice following intramuscular injection of AAV1 serotype vectors. *Mol Ther* 2001, 4:217–222
42. Taskinen M-R Lipoprotein lipase in hypertriglyceridemias. In: Borensztajn J, editor. *Lipoprotein lipase*. Chicago: Evener Publishers, 1987:201.

HEME-OXYGENASE 1 VERSUS CARCINOGENESIS.**1. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and its products.**

Heme oxygenases catalyze a rate-limiting step in heme degradation, producing equimolar quantities of biliverdin, iron, and carbon monoxide (CO) (Fig. 1). Biliverdin is subsequently converted to bilirubin by biliverdin reductase. Two forms of heme oxygenases have been characterized: an inducible enzyme, HO-1, and a constitutive isoform, HO-2. A third isoform HO-3, has also been described but turned out to be a pseudogene [34, 12]. HO-1 (32 kDa) is localized mostly to microsomes but it was also reported to translocate to nucleus, as in case of a prostate cancer cells [32]. HO-2 (36 kDa) is localized to mitochondria of the endothelial cells and adventitial nerves of blood vessels and may function as a physiological regulator of cellular function such as blood pressure [36], whereas HO-1 plays a cytoprotective role in modulating tissue responses to injury in pathophysiological states [40].

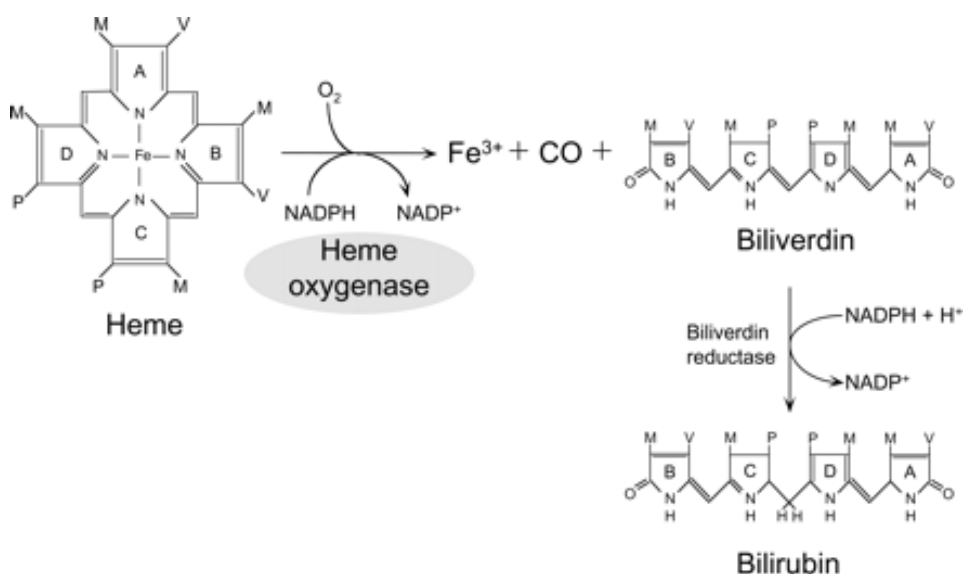


Figure 1. HO-1 activity in the cell. From [27]

HO-1 activity enables the removal of heme, resulting in the generation of the heme metabolites bilirubin and biliverdin that have significant antioxidant and anticomplement properties [37]. HO-1 is also an important player in physiological processes like angiogenesis [17], cell cycle regulation [11,22] and apoptosis [14], or during induction and progression of pathological processes, e.g. atherosclerosis [25], restenosis [30], and tumor growth [41].

2. Role of HO-1 in proliferation of different cells.

HO-1 acts differently in various types of cells. In vascular endothelium [17] or epidermal keratinocytes [5] induction of HO-1 enhances the response to mitogens and activates proliferation, whereas in epithelial cells [1] or fibroblasts [31] HO-1 acts in an opposite way – decreases cell division. Putative mediator of such action is CO, which can downregulate p21 protein and thereby increase proliferation [21] (Fig. 2). On the other hand, HO-1-deriving CO can stimulate the p38 kinase through induction of soluble guanyl cyclase (sGC) and elevation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP). It results in cell cycle arrest [15,18]. Also in some tumors, like hepatoma [8], melanoma [41], or pancreatic cancer [3], the pro-proliferative effect of HO-1 was observed. Overexpression of HO-1 was also connected with the enhanced growth of tumors and increased metastatic abilities [38,41].

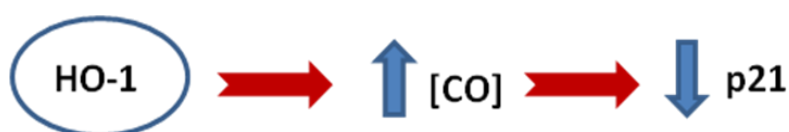


Figure 2. HO-1 downregulates p21

3. Role of HO-1 in apoptosis.

HO-1 plays an antiapoptotic role what can be associated with its antioxidative potency, as reactive oxygen species (ROS) are well described inducers of apoptosis in many cell types [16]. One reason of such HO-1 action, may be the decrease of cellular levels of iron, like in embryonic fibroblasts [9], where free iron induces the expression of the iron-sequestering ferritin and activates Fe-ATPase, an iron transporter, which decrease intracellular Fe^{2+} content [35]. Other enzymatic product, namely antioxidant bilirubin also seem to play an important role.

4. Carcinogenesis and methods of its initiation.

Carcinogenesis is a process, in which a normal cell changes into a cancerous one. Such transformed cell possesses at least two features: impaired cell cycle control, and ability to invade and spread to other tissues [26]. Among many causes of carcinogenesis, the most common are: 1) radiation (like UV, X or γ), 2) chemical compounds called mutagens or carcinogens, 3) infection with some DNA and RNA viruses (like polyoma virus or Epstein-Barr virus) [26].

Carcinogenesis consists of several consecutive steps: 1) preinitiation – when the mutagens react with DNA causing mutations, 2) initiation – once the mutation exists and induces other changes; 3) progression – the transformed cell starts to divide in uncontrolled way generating *in situ* carcinoma; 4) malignancy – is connected with the enhanced migration and ability of cell to metastasize [2] (Fig. 3).

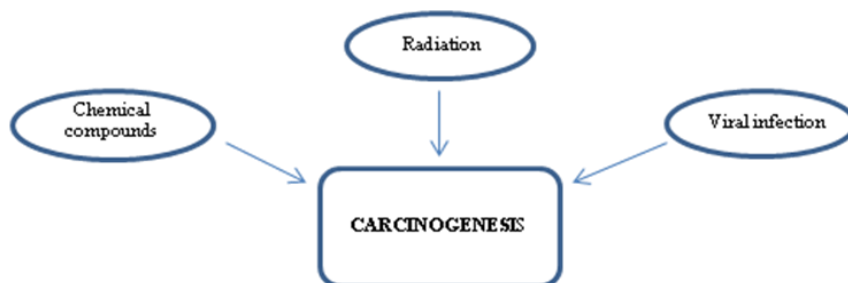


Figure 3. Ways of carcinogenesis initiation.

5. Role of HO-1 in tumors.

The role of HO-1 in tumor progression is not fully characterized. Interestingly, HO-1 is upregulated in many types of neoplasms like renal cancer [10], prostate cancer [23] or lymphoma [33]. Furthermore, HO-1 expression may be enhanced in response to chemotherapy or photodynamic therapy [8,28]. As HO-1 plays a protective role [31,42] by reducing oxidative stress and increasing resistance to apoptosis, it can be expected to protect the cells against chemotherapeutics. Pharmacological or genetic upregulation of HO-1 significantly improves survival of hepatoma [8] or melanoma [41]. Furthermore, decreased viability resulting from HO-1 inhibition was found in colon carcinoma [4] and in chronic myelogenous leukemia cells [24]. Importantly, HO-1 inhibitors or targeted knockdown of HO-1 expression makes the cultured tumor cell lines much more sensitive to anticancer therapy, whereas HO-1 activation can efficiently protect them. The most

important observations seem to be, however, those made *in vivo*, in tumor-bearing animals subjected to anticancer therapies. Generally, they confirm conclusions from data obtained *in vitro*: induction of HO-1 protects tumor cells, whereas its inhibition increases the efficacy of anticancer therapies [3].

One of the important function of HO-1 is the stimulation of angiogenesis [38] that is a limiting point in the growth of many tumors. The influence of HO-1 on angiogenesis in tumors was suggested firstly on the basis of observations that expression of HO-1 in macrophages infiltrating the tumors seems to correlate with increased vascular density [7, 38] as shown in human gliomas [27] and human vertical growth melanomas [39]. Then it was reported that HO-1 accelerates melanoma and pancreatic cancer growth by promoting tumor angiogenesis in mice [38, 41].

Although there are many papers showing the role of HO-1 in tumor progression, the significance of HO-1 in tumor initiation is poorly understood. Some clinical analyses indicate that HO-1 promoter polymorphism may influence the frequency of tumor occurrence. Human HO-1 gene promoter is highly polymorphic, mainly because of variation in the number of GT repeats in a microsatellite DNA fragment ranging from 11 to 40 [20]. This purine-pyrimidine-alternating sequence can negatively affect transcription, especially as it is located between the regulatory elements and TATA box of the HO-1 gene [29]. The importance of a promoter polymorphism was confirmed in lymphoblastoid cell lines derived from human subjects possessing short (S/S) or long (L/L) HO-1 genotypes. After H₂O₂ stimulation, the S/S cells showed much higher activity of HO-1 enzyme than did their L/L counterparts. Furthermore, only S/S promoters ensured protection of lymphoblastoid cells from H₂O₂-induced apoptosis [13].

Recent reports indicate that lack of short allele and resulting lower activity of HO-1 can be associated with a higher incidence of cancers. One of studies was performed in the Japanese population. In this group, the proportion of class L allele frequencies was significantly higher in patients with lung adenocarcinoma than in control subjects. Furthermore, the risk of lung adenocarcinoma for L allele carriers versus non-L allele carriers was increased in the group of male smokers. However, in the female nonsmokers, the proportion of L allele carriers did not differ between patients and control subjects [19]. Another study concerned the oral squamous cell carcinoma (OSCC) caused by betel chewing in an Asian population. Also in this case, the longer (GT)_n repeat allele in the HO-1 promoter is associated with the increased risks of accelerated OSCC, whereas the shorter (GT)_n repeat allele may have protective effects for OSCC [6].

6. Summary

Heme oxygenase – 1 may be described as a two-face factor and its role differs in case of several types of tumors. HO-1 may also be called as a cell's friend – it protects the healthy cells but also contributes to the survival of the already initiated cells. Therefore, one of the major potential applications, might be the silencing of HO-1 in tumor cells that would sensitize the cells to anticancer therapies.

7. Literatura

1. Aizawa T et al. Different effects of angiotensin II and catecholamine on renal cell apoptosis and proliferation in rats. *Kidney Int.* 2001, 59:645–653.
2. Bal J „Biologia molekularna w medycynie” Wydawnictwo Naukowe PWN 2006.
3. Berberat PO et al. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clin Cancer Res.* 2005, 11(10):3790-8.
4. Bussierolles J et al. Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006, 38:1510–1517.
5. Clark JE et al. Involvement of the heme oxygenase-carbon monoxide pathway in keratinocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;241:215–220.
6. Chang KW et al. Polymorphism in heme oxygenase-1 (HO-1) promoter is related to the risk of oral squamous cell carcinoma occurring on male areca chewers. *Br J Cancer.* 2004;91:1551–1555.
7. Deininger MH et al. Heme oxygenase (HO)-1 expressing macrophages/microglial cells accumulate during oligodendroglioma progression. *Brain Res.* 2000, 882:1–8.
8. Doi K et al. Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br J Cancer* 1999, 80(12):1945-54.
9. Fang J et al. In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res.* 2003, 63(13):3567-74.
10. Goodman AI et al. Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997, 214(1):54-61.
11. Hanselmann C et al. Haem oxygenase-1: a novel player in cutaneous wound repair and psoriasis? *Biochem J.* 2001, 353:459-466.
12. Hayashi S et al. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene.* 2004 Jul 21;336(2):241-50.
13. Hirai H et al. Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines. *Blood.* 2003;102:1619–1621.
14. Inguaggiato P et al. Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis. *Kidney Int.* 2001, 60(6):2181-91.
15. Iwasa H et al. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells.* 2003, 8:131–144.
16. Johnson TM et al. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, 93:11848–11852.
17. Jozkowicz A et al. Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX. *Antioxid Redox Signal.* 2003, 5:155-162.

18. Jozkowicz A et al. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid Redox Signal*. 2007, 9(12):2099-117.
19. Kikuchi A et al. Association of susceptibility to the development of lung adenocarcinoma with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism. *Hum Genet*. 2005;116:354-360.
20. Kimpara T et al. Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease. *Hum Genet*. 1997;100:145-147.
21. Li Volti G et al. Carbon monoxide signaling in promoting angiogenesis in human microvessel endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2005, 7(5-6):704-10.
22. Li Volti G et al. Differential effect of heme oxygenase-1 in endothelial and smooth muscle cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002, 296:1077-1082.
23. Maines MD The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997, 37:517-54.
24. Mayerhofer M et al. Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2004, 64:3148-3154.
25. Morita T Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005, 25:1786-1795.
26. Murray RK et al. „Biochemia Harpera”. Wydawnictwo lekarskie PZWL 2004.
27. Nishie A et al. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res*. 1999, 5:1107-1113.
28. Nowis D et al. Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene*. 2006, 25(24):3365-74.
29. Okamoto I et al. A microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with risk for melanoma. *Int J Cancer*. 2006;119:1312-1315.
30. Otterbein LE et al. Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med*. 2003, 9:183-190.
31. Petrache I et al. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000, 278:L312-L319.
32. Sacca P et al. Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. *Br J Cancer*. 2007 Dec 17;97(12):1683-9; 30.
33. Schacter BA et al. Alterations in microsomal drug metabolism and heme oxygenase activity in isolated hepatic parenchymal and sinusoidal cells in Murphy-Sturm lymphosarcoma-bearing rats. *Clin Invest Med*. 1986, 9(3):150-5.
34. Sikorski EM et al. The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004, 286(3):F425-41.
35. Snyder SH et al. Heme oxygenase: a font of multiple messengers. *Neuropsychopharmacology*. 2001 Sep;25(3):294-8
36. Stec DE et al. Blood pressure and renal blood flow responses in heme oxygenase-2 knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Oct 21.
37. Stocker R. Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic Res Commun*. 1990;9(2):101-12.
38. Sunamura M et al. Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis*. 2003, 6(1):15-24.
39. Torisu-Itakura H et al. Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn J Cancer Res*. 2000, 91:906-910.
40. Wagoner FA et al. Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999, 291(1):416-23.

41. Was H et al. Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. *Am J Pathol.* 2006, 169:2181-2198.
42. Yachie A et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest.* 1999, 103(1):129-35.

