

Wirusowe nośniki genów w neurobiologii

Kamila Duniec

Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN,
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Streszczenie

Opracowanie skutecznych i bezpiecznych sposobów wprowadzania genów do żyjących komórek daje możliwość zbadania molekularnych mechanizmów funkcji ośrodkowego układu nerwowego, a także daje nadzieję na terapię genową nieuleczalnych dziś chorób o podłożu genetycznym. Podstawą obecnie stosowanych technologii są tzw. wektory, czyli nośniki genów. Najwięcej nadziei pokłada się w wektorach wirusowych, czyli tak zmodyfikowanych wirusach, aby nie miały zdolności namnażania się, a więc były niegroźne dla organizmu, a zarazem żeby były skuteczne we wprowadzaniu do komórek docelowych badanego transgenu. Do przenoszenia genów do dojrzałych komórek nerwowych najczęściej używa się wektorów pochodzących od wirusów opryszczki (HSV), od adenowirusów, od parwowirusów oraz od lentiwirusów.

Wirusowe nośniki genów w neurobiologii

Wprowadzanie genów do komórek umożliwia bezpośrednią analizę funkcji i efektu terapeutycznego danego białka w żywym organizmie. Technika ta przyciągnęła uwagę ze względu na możliwość odpowiedzenia na fundamentalne pytania w biologii oraz ze względu na możliwość leczenia chorób uwarunkowanych genetycznie jak i nabytych, gdy te związane są z nieodpowiednim poziomem białka. Zastosowanie transferu genów nie jest ograniczone do terapii genowej chorób dziedzicznych. Technika ta może być także wykorzystana do zmiany i wprowadzenia nowych funkcji komórek w nadziei, że będzie to korzystne. Poza tym wektory wirusowe wykorzystuje się w terapii komórkowej *ex vivo*, do przyżyciowego wyznaczania neuronów ośrodkowego układu nerwowego, a także do otrzymywania transgenicznych zwierząt.

Dostarczenie i ekspresja transgenu zależy od efektywności, specyficzności i bezpieczeństwa wektora, który wprowadza gen do jądra komórkowego. Wektory można podzielić na wirusowe i niewirusowe. Wektory wirusowe wykorzystują wewnętrzny potencjał wirusów do wprowadzania swojego materiału genetycznego, DNA lub RNA, do jądra komórki gospodarza. Ta umiejętność sprawia, że wirusy są skutecznym narzędziem do wprowadzania egzogennej DNA do szerokiego zakresu rodzajów komórek. Od lat 1980-tych rozwijanych jest kilka systemów wektorów wirusowych, z których każdy ma swoje zalety i ograniczenia.

Wektory niewirusowe natomiast oparte są na komórkowym pobieraniu kompleksów bioorganicznych. Niska efektywność transferu genów tymi metodami *in vivo* jest wielkim ograniczeniem technik niewirusowych.

Typy wektorów wirusowych

Dotychczas opierano się głównie na czterech wirusach tworząc wektory do wprowadzania egzogennej genów bezpośrednio do układu nerwowego: wirus opryszczki (*herpes simplex virus*, HSV), adenowirus (Ad), parwowirus - związany z adenowirusem (*adenovirus associated virus*, AAV) oraz lentiwirus.

Pierwszy wektor wirusowy, który umożliwił bezpośrednią manipulację genetyczną w układzie nerwowym, oparty był na HSV. Wirus ten został wybrany ze względu na swoją neurotropiczną naturę oraz zdolność do pozostawania w stanie latencji w neuronach przez długi czas. W 1993 roku pokazano, że adenowirus może służyć za wektor dla układu nerwowego (Le Gal La Salle i wsp. 1993). Do tamtego roku adenowirusy były przede wszystkim używane do transdukcji komórek układu oddechowego – naturalnej tkanki docelowej adenowirusów (Rosenfeld i wsp. 1992). Dwa lata później ukazały się AAV jako wektory dla układu nerwowego (Kaplitt i wsp. 1994), a w 1996 pokazała się pierwsza praca oparta na wektorze lentiwirusowym (Naldini i wsp. 1996).

Omawiane systemy wektorów mogą być przypisane dwóm głównym rodzajom: rekombinowanym i defektywnym wektorom wirusowym. Rekombinowany

wektor wirusowy nosi obcy gen we własnym genomie. Insercja obcego genu osiągnięta jest przez rekombinację homologiczną i wynika delecją jednego lub więcej genów wirusa, niezbędnych do jego replikacji. Rekombinowany wektor wirusowy może być namnożony w komórkach, które posiadają ulegające ekspresji geny usunięte z wirusa. Przykładem wektorów rekombinowanych są wektory adenowirusowe oraz niektóre wektory HSV (Tabela 1).

Defektywne wektory wirusowe istnieją dzięki temu, że replikacja jak i pakowanie genomu wirusa do kapsydu jest zarządzane przez małe sekwencje nie kodujące białek, działające cis w genomie wirusa. Wprowadzenie takich sekwencji cis do plazmidu zawierającego obcy gen skutkuje zapakowaniem tego plazmidu do kapsydu w obecności wirusa pomocniczego. Wektory HSV oparte na amplikonie oraz AAV są przykładami defektywnych wektorów wirusowych. Istotną różnicą pomiędzy wektorami rekombinowanymi oraz defektywnymi jest fakt, że wektory rekombinowane utrzymują wiele ze swoich naturalnych genów, podczas gdy wektory defektywne nie posiadają żadnych takich genów oprócz sekwencji umożliwiających pakowanie do kapsydu.

Wektory wirusa opryszczki HSV

Genom wirusa HSV jest liniową, dwuniciową cząsteczką DNA o długości 152 kb. Po infekcji komórek nabłonka natywnym wirusem HSV zachodzi ekspresja kaskady genów wirusa, która prowadzi do produkcji wirusa. Wyprodukowane wirusy mogą wejść do wypustek neuronów czuciowych unerwiających okolice zainfekowaną pierwotnie. Następuje wtedy transport wsteczny wzdłuż neurytu do jądra ciała neuronu. Tam wirus może wywołać infekcję lityczną lub latentną. W infekcji latentnej genom wirusa zostaje związany z białkami histonowymi tworząc strukturę chromatynopodobną i następnie zachodzi ekspresja genów LAT (latency-associated transcripts). Okres latencji może trwać przez całe życie gospodarza, ale stres, środki farmakologiczne oraz promieniowanie ultrafioletowe mogą indukować infekcję lityczną. Wtedy ekspresowane są trzy klasy genów: IE (immediate-early), E (early) oraz L (late). Efektywny system wektora może być stworzony tylko przez wymuszenie stabilnej latencji i uniemożliwienie nastąpienia cytotoksycznego cyklu litycznego przez zmutowanie lub usunięcie genów IE, a w szczególności ICP4 i ICP27. Jednakże okazało

Tabela 1

| Właściwości | Wektory | | | |
|--|-------------------------------|----------------------|---------------------------|------------------------------|
| | Adenowirusowe 1. generacji | HSV | lentiwirusowe | AAV |
| Rozmiar genomu wirusa | 36 kb | 152 kb | 7 kb | 4,7 kb |
| Maksymalna wielkość insertu | ~8 kb | 15 kb | 7-9 kb | ~4 kb |
| Średnica | 80 nm | 200 nm | 80 nm | 20 nm |
| Wektor w jądrze komórkowym | episomalny | episomalny | zintegrowany | episomalny / zintegrowany |
| Wektory defektywne / rekombinowane | rekombinowane | defektywne | defektywne | defektywne |
| Otrzymywane stężenie maks. (cząst. wirusa / ml) | wysokie 10^{12} | wysokie 10^{10} | niskie 10^2 - 10^6 | średnie 10^8 - 10^9 |
| Podziały komórek gospodarza | nie wymagane | | | |
| Immunogenność wektora | wysoka / niska | wysoka | niska | niska |
| Zanieczyszczenie wirusem dzikim lub pomocniczym | minimalne | tak / nie | brak | minimalne |
| Efektywność transdukcji <i>in vivo</i> | wysoka | średnia | średnia | średnia-wysoka |
| czas trwania ekspresji transgenu | tygodnie - miesiące | dni | długotrwała | długotrwała |

się, że takie mutanty powodują nekrozę wokół miejsca iniekcji z powodu cytotoksycznego nagromadzenia się produktów pozostałych genów IE.

Obok cytotoksyczności największym problemem wektorów HSV jest krótki czas trwania ekspresji wprowadzonego genu. Ekspresja genu reporterowego, LacZ, w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym trwała nie dłużej niż 4 dni, gdy wrekombinowano go w miejsce genu kinazy tymidynowej (tk), zbędnego, gdy gospodarzem jest komórka eukariotyczna, pod promotorem tk, ICP4 lub ICP8. Pod promotorem LAT ekspresja genu β -galaktozydazy w pniu mózgu myszy trwała do 4 miesięcy (Hermens i wsp. 1998).

Wektory defektywne, często nazywane amplikonami, nie wykazują cytotoksyczności, ale niezbędne do ich namnożenia wirusy pomocnicze wywołują efekty neuropatologiczne. Pierwszy defektywny wektor HSV wstrzyknięty *in vivo* do mózgu szczura, zawierał gen LacZ pod promotorem CMV i wykazywał ekspresję β -galaktozydazy przez co najmniej 2 tygodnie, a po zastosowaniu specjalnej metody umożliwiającej oddzielenie plazmidów od wirusów pomocniczych ekspresja β -galaktozydazy obserwowana była przez ponad miesiąc *in vivo*. Mimo to, metoda ta jest bardzo wymagająca technicznie i mało wydajna w produkcji amplikonów.

Wektory adenowirusowe

We wczesnych latach 1990-tych skonstruowano wektory adenowirusowe oparte na ludzkim adenowirusie rodzaju 5 (Ad5), które posłużyły do infekcji komórek nie dzielących się, takich jak neurony, z większą efektywnością i jednocześnie niższą patogennością niż wcześniej stosowane wektory HSV. Dziki adenowirus zawiera liniowy, dwuniciowy DNA (~36 kb) z sekwencją ITR (odwrócone powtórzenie końcowe) na każdym końcu. Genom ten pakowany jest do ikosaedralnego kapsydu bez osłonki o średnicy około 80 nm. Adsorpcja cząsteczki adenowirusa do komórki gospodarza jest zainicjowana przez interakcję białka kapsydu ze swoistym receptorem CAR (coxackie-adenovirus receptor). Następnie białko kapsydu wirusa wiąże się do integryn związanych z błoną cytoplazmatyczną infekowanej komórki, po czym cząsteczka wirusa zostaje internalizowana na drodze endocytozy (Nemerow 2000). Nukleokapsyd wirusa, następnie, uwalniany jest z endosomu i transportowany do jądra komórkowego, gdzie genom wirusa jest uwalniany i pozostaje nie win-

tegowany w genom gospodarza, czyli pozostaje w postaci episomalnej.

Genom adenowirusa koduje pięć wczesnych transkryptów (E1A, E1B, E2, E3 i E4) i geny późne (L). Gen E1 jest transkrybowany od razu po wejściu do jądra komórkowego i koduje serię aktywatorów transkrypcji, które z kolei aktywują ekspresję innych genów E. Gen E1 jest także kluczowy dla replikacji wirusowego DNA i poprzez aktywację pozostałych genów E ważny jest też dla ekspresji genów L. Geny L kodują białka kapsydu, które są konieczne do kapsydacji kopii DNA wirusa, a więc do produkcji nowych cząsteczek wirusa (Wang i wsp. 2000).

Przy produkcji nie replikujących wektorów adenowirusowych pierwszej generacji, wycinana jest sekwencja ITR zawierająca Ad5- miejsce rozpoczęcia replikacji (ORIGIN), sygnał pakowania (sekwencja ' ψ ') oraz gen E1 (wektory pierwszej generacji) oraz często E3, a jeszcze więcej genów genomu dzikiego wirusa usuwanych jest w przypadku wektorów drugiej lub wyższej generacji.

Delecje w regionie E1 uniemożliwiają aktywację genów E i L, co ogromnie redukuje transkrypcję wirusowych genów E i L oraz uniemożliwia replikację DNA wirusa, jednakże przy wysokich MOI region E1 staje się zbędny do replikacji. Może to być związane z ekspresją komórkowych transaktywatorów, w komórce gospodarza, o funkcji podobnej do E1. W efekcie może nastąpić niezależna od E1 replikacja DNA wirusa prowadząca do akumulacji białek wirusa i cytotoksycznego efektu w transdukowanych komórkach z aktywacją układu odpornościowego. Być może z tego względu wektory pierwszej generacji początkowo wykazywały krótkotrwałą ekspresję transgeny. Mimo to Byrnes i wsp. (1995) wykazał stałą ekspresję transgeny w neuronach i komórkach glejowych prądkowia przez ponad 2 miesiące, pomimo obserwowanej odpowiedzi odpornościowej. Obecnie usuwany jest także region E3, który dodatkowo utrudnia niekontrolowane namnażanie się wektorów adenowirusowych pierwszej generacji (Ryc. 1).

Wykazano, że zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, wektory adenowirusowe mają zdolność infekowania głównych rodzajów komórek ośrodkowego układu nerwowego (neurony, astrocyty, oligodendrocyty, komórki wyściółki, Kügler i wsp. 2001).

Argumenty za użyciem wektorów adenowirusowych:

1. bezpieczeństwo użycia



Ryc. 1. Uproszczony schemat fragmentu DNA wektora adenowirusowego I generacji. E2-4 to wczesne transkrypty genomu wirusa. Strzałki reprezentują kierunek transkrypcji. Region E1 zostaje usunięty na drodze rekombinacji homologicznej (krzyżujące się przerywane linie) i zastąpiony przez konstrukt ITR-RSV-LacZ; ITR – odwrócona sekwencja powtarzana, RSV – promotor wirusa mięsaka Rousa, LacZ – gen kodujący β-gal.

2. brak związku z onkogenicznością u ludzi
3. dobrze opisany, łatwy do manipulowania genom
4. stabilność wektorów rekombinowanych
5. możliwość produkowania cząsteczek wirusa o wysokim mianie
6. stosunkowo wysoka wydajność pobierania wektorów do komórek *in vivo*
7. brak dowodów na spontaniczną integrację genomu gospodarza

W 1994 roku Engelhardt i wsp. rozwinął wektory Ad pozbawione regionu E1, części regionu E3 oraz z mutacją w genie E2A kodującym białko DBP (single-stranded DNA-binding protein) powodującą wrażliwość na temperaturę powyżej 40.5 °C. Mutacja ta uniemożliwia elongację Ad DNA podczas replikacji (Kovesdi i wsp. 1997). Takie wektory drugiej generacji powodowały stan zapalny, a mutacja E2A często ulegała rewersji. Dlatego w 1996 roku powstały wektory adenowirusowe z dużymi delecjami w E2A i E2B. Te wektory nie zostały jednak zbadane w kontekście układu nerwowego (Zhou i wsp. 1996).

Wektory trzeciej generacji mają delecje w regionie E1 i E4. Wektory te, tak jak poprzednie generacje, wywołują reakcję zapalną *in vivo*, przy czym prawdopodobnie jest ona częściowo zależna od promotora i genu obecnego w takim wektorze (Hermens i wsp. 1998).

Kolejny etap to powstanie wektorów Ad z delecją wszystkich genów dzikiego adenowirusa - wektory minimalne. Taki konstrukt składa się z genu pod kontrolą wybranego promotora, np. gen LacZ pod promotorem RSV, oflankowanych przez sekwencje ITR, razem z sygnałem pakowania. Problem przy tym podejściu stanowi niemożność całkowitego rozdzielenia wektorów minimalnych od wektorów pomocniczych - niezbędnych do namnożenia tych pierwszych. Taki stan rzeczy może powodować silną odpowiedź odpornościową organizmu gospodarza.

Wektory AAV

AAV jest nie replikującym, jednym z parwowirusów, *Parvovirae*, najmniejszych i strukturalnie najprostszych zwierzęcych wirusów DNA. AAV może się rozprzestrzeniać jako wirus lityczny, w obecności Ad, lub jako prowirus zintegrowany z genomem gospodarza (u człowieka preferowany chromosom 19). Wektory AAV są pozbawione 96% dzikiego genomu. Pozostawiono tylko sekwencje ITR, wystarczające do pakowania DNA do kapsydu i integracji z genomem gospodarza. Wektory AAV do namnożenia wymagają wirusa pomocniczego, z którego mogą one być łatwo oczyszczone. We wstępnych badaniach wykazano, że wektory AAV są w stanie efektywnie wprowadzić geny do neuronów, przy czym nie zaobserwowano znaczącej transdukcji gleju, ani efektów cytopatologicznych (Björklund i wsp. 2000).

Wektory lentiwirusowe

Do niedawna najczęściej używanymi wektorami retrowirusowymi były te oparte na MLV, wirusie mysiej białaczki, (murine leukemia virus). Ważną właściwością tych wektorów jest stabilność ich integracji do genomu gospodarza i długotrwała ekspresja transgeny. Jednakże te wektory potrafią wprowadzić swój genom tylko do dzielących się komórek.

Stosunkowo niedawno zaczęto wykorzystywać wektory lentiwirusowe oparte na wirusie HIV1. Zalety tych wektorów to:

1. zdolność infekowania zróżnicowanych, nie dzielących się komórek jak neurony;
2. integracja materiału genetycznego do genomu gospodarza, co daje stabilną ekspresję transgeny;
3. stosunkowa łatwość i szybkość wyprodukowania;



Ryc. 2. Uproszczony schemat genomu wektora lentiwirusowego. LTR - długie powtórzenia końcowe, ψ - sygnał pakowania do kapsydu, RRE- rev responsive element - miejsce przyłączenia się wirusowego czynnika transkrypcyjnego REV, TRIP - element ułatwiający transport materiału genetycznego wektora wirusowego do jądra komórki infekowanej, WPRE - potranslacyjny element regulatorowy. Strzałka reprezentuje kierunek transkrypcji transgenu.

4. możliwość pozabawienia prawie wszystkich natywnych genów i sekwencji regulatorowych, co daje odpowiedni poziom bezpieczeństwa;

Wektory lentiwirusowe są produkowane poprzez wapniową ko-transfekcję linii komórkowej HEK 293T trzema plazmidami: plazmidem zawierającym genom produkowanego wektora, plazmidem zawierającym elementy kodujące białka kapsydu oraz plazmidem zawierającym geny i elementy regulatorowe niezbędne do namnożenia materiału genetycznego wirusa oraz elementów strukturalnych. Tak powstałe i namnożone wektory lentiwirusowe są oczyszczane i zagęszczane na komercyjnie dostępnych kolumnach lub poprzez ultrawirowanie (Ryc. 2).

Pierwsze próby z wykorzystaniem wektorów lentiwirusowych pokazały, że iniekcja zawiesiny wektora o wysokim mianie dała ekspresję wprowadzonego genu LacZ w znacznej liczbie komórek (m.in. w hipokampie), po 7, 28 i 42 dniach, bez obserwowanego miejscowego zniszczenia tkanki, ani odpowiedzi odpornościowej (Besadoun i wsp. 2000, Naldini i wsp. 1996).

Wszystkie wektory wirusowe wykorzystywane w układzie nerwowym są stale ulepszane i wybór któregośkolwiek z nich zależy od wymagań przeprowadzanych doświadczeń oraz od dostępności danego wektora.

Bibliografia

- Bensadoun JC, Déglon N, Tseng JL, Ridet JL, Zurn AD, Aebischer P (2000) Lentiviral vectors as a gene delivery system in the mouse midbrain: cellular and behavioral improvements in a 6-OHDA model of Parkinson's disease using GDNF. *Exp. Neurol.* 164: 15-24.
- Björklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, Mandel RJ (2000) Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res.* 886: 82-98.
- Byrnes AP, Rusby JE, Wood MJA, Charlton HM (1995) Adenovirus gene transfer causes inflammation in the brain. *Neurosci.* 66: 1015-1024.
- Engelhardt JF, Ye X, Doranz B, Wilson JM (1994) Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse. *PNAS* 91: 6196-6200.
- Hermens WT, Giger RJ, Holtmaat AJ, Dijkhuizen PA, Houweling DA, Verhaagen J (1997) Transient gene transfer to neurons and glia: analysis of adenoviral vector performance in the CNS and PNS. *J. Neurosci. Meth.* 71: 85-98.
- Hermens WT, Verhaagen J (1998) Viral vectors, tools for gene transfer in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 55: 399-432.
- Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, Xiao X, Pfaff DW, O'Malley KL, During MJ (1994) Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat. Genet.* 8: 148-154.
- Kovesdi I, Brough DE, Bruder JT, Wickham TJ (1997) Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr. Op. Biotechnol.* 8: 583-589.
- Le Gal La Salle G, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Mallet J (1993) An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 259:988-990.
- Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) In vivo delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263-267.
- Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Rosenthal ER, Dalemans W, Fukayama M, Bargon J, Stier LE, Stratford-Perricaudet L (1992) In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 68: 143-155.
- Wang Y, Huang S (2000) Adenovirus technology for gene manipulation and functional studies. *DDT* 5: 10-16.
- Zhou H, O'Neal W, Morral N, Beaudet AL (1996) Development of a complementing cell line and a system for construction of adenovirus vectors with E1 and E2a deleted. *J. Virol.* 70: 7030-7038.