



WYŻSZA SZKOŁA ZAWODOWA PIELEGNACJI ZDROWIA I URODY
w Poznaniu

Inżynieria genetyczna, klonowanie, terapia genowa

dr n. med. Bogusław Nedoszytko

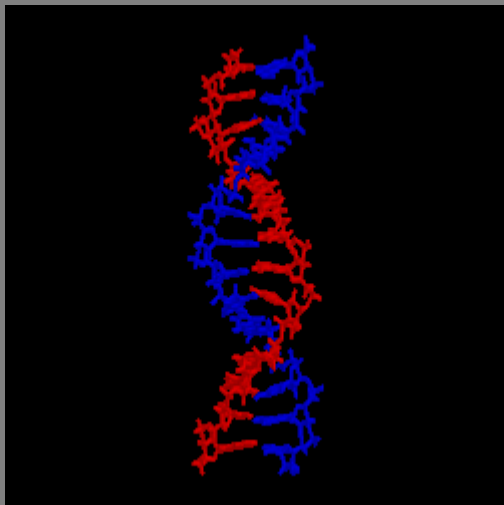
WSZPIZU

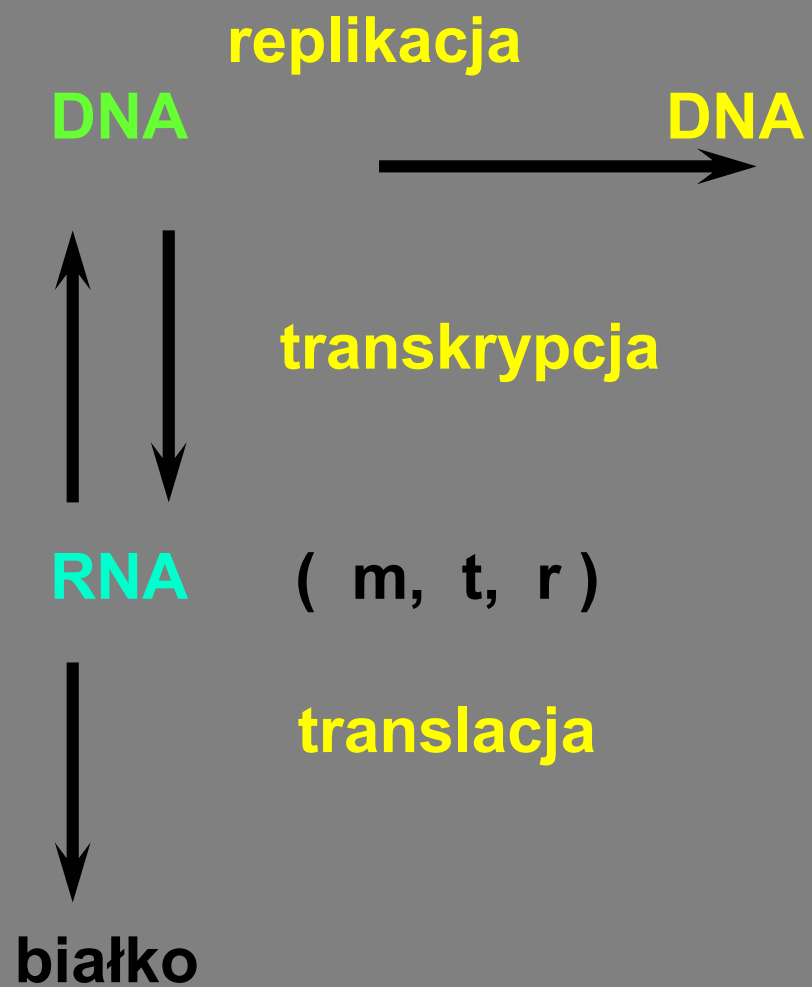
Wydział w Gdyni



Gen - odcinek kwasu dezoksynukleinowego (DNA) kodujący jeden łańcuch polipeptydowy lub jedną cząsteczkę kwasu rybonukleinowego (RNA).

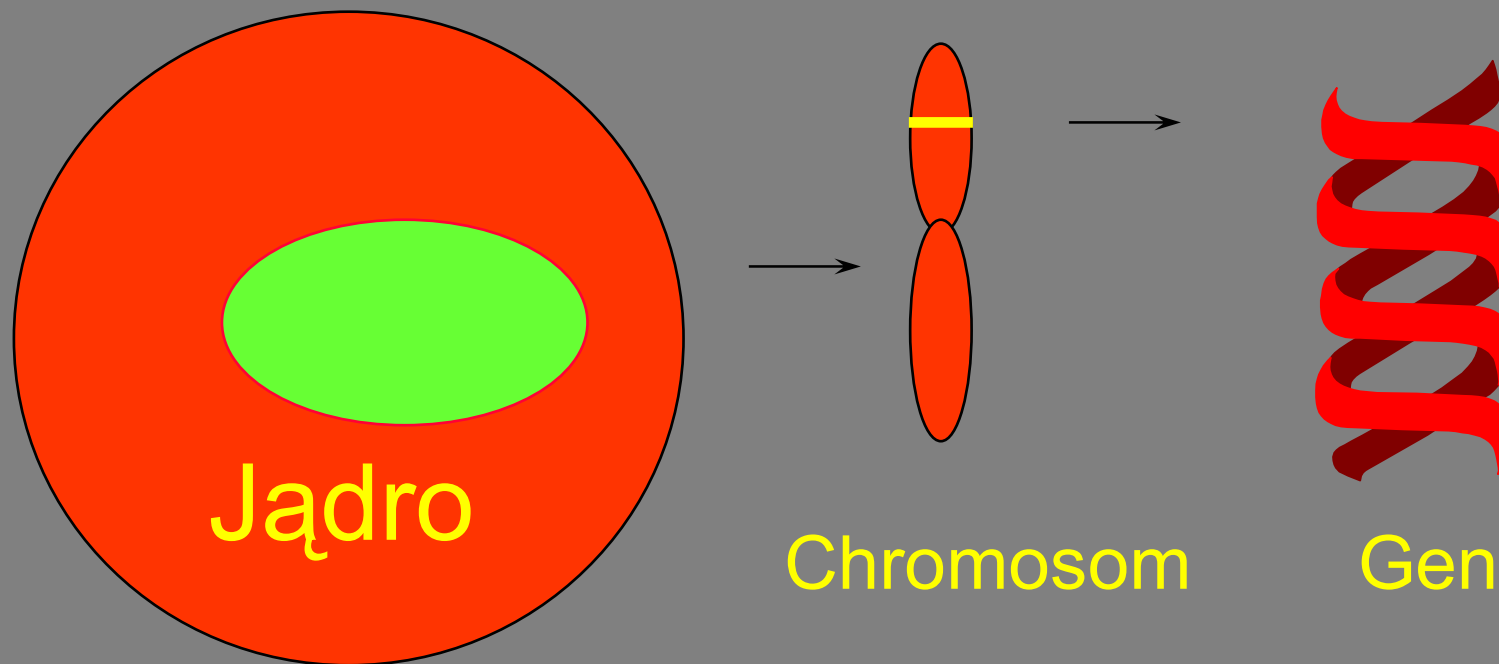
Gen - odcinek DNA kodujący jeden łańcuch polipeptydowy.





Gen - odcinek DNA kodujący jeden łańcuch polipeptydowy.

Gen zajmuje stałe miejsce (**locus**) w chromosomie homologicznym



Genom człowieka:

46 chromosomów

2,6 metra DNA

3 miliardy par nukleotydów (A,T,G,C)

30 000 – 40 000 genów

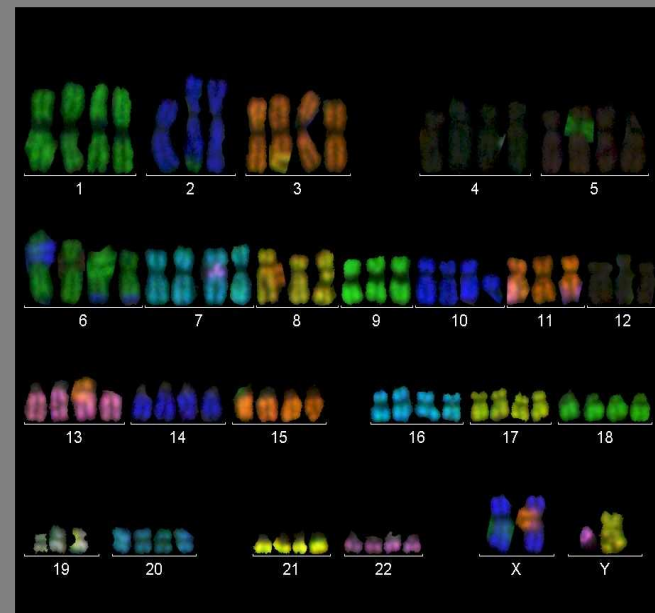
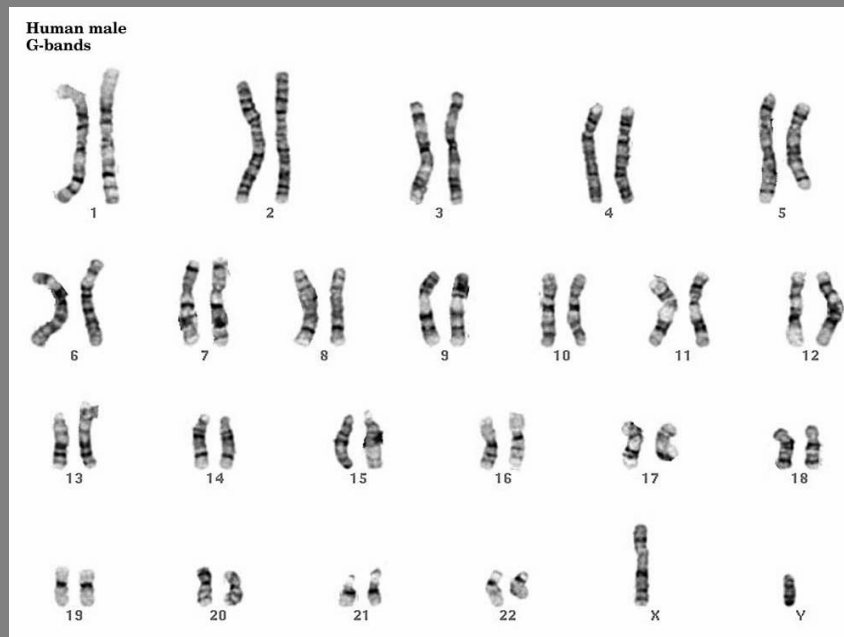


**Gen 1000 - 200 000 par
nukleotydów**

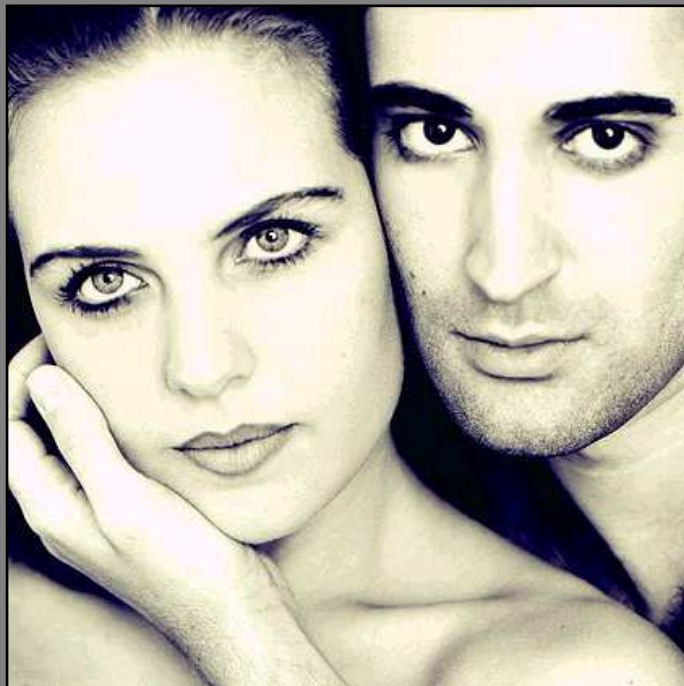
Cecha autosomalna - cecha kodowana przez gen mający swój locus w chromosomach autosomalnych.

Cecha sprzężona z płcią (z chromosomem X) - cecha kodowana przez gen mający swój locus w chromosomie płciowym X.

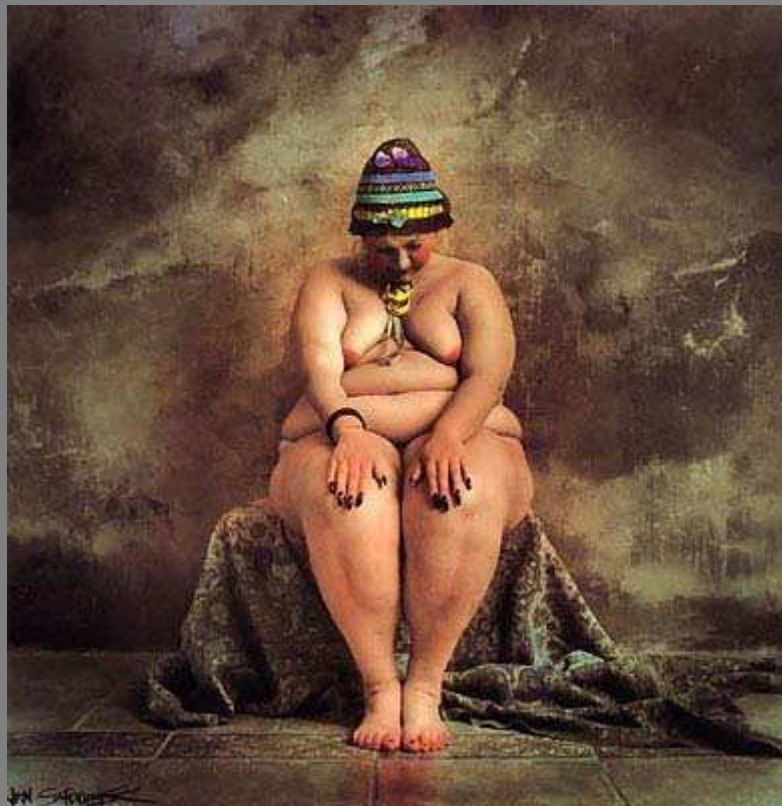
Cecha holandryczna - cecha kodowana przez gen mający swój locus w chromosomie płciowym Y.



Fenotyp - obserwowane cechy charakterystyczne osobnika, których ujawnianie się jest wynikiem oddziaływania czynników genetycznych i środowiskowych.



Ekspresja genu - stopień fenotypowego przejawiania się genu. **Stopień nasilenia cechy, objawów** .



1944r, **Avery, McLeod, McCarty** publikują pracę stwierdzającą, że czynnikiem, który może przywracać infekcyjność bakterii *Streptococcus pneumoniae* (dwoinka zapalenia płuc), jest czysty DNA.

1950r , **E. Chargraff** odkrywa "alfabet DNA", czyli skład nici DNA oraz przedstawia regułę, głoszącą, że liczba zasad pirymidynowych w DNA jest równa liczbie zasad purynowych.

1953r, **J. D. Watson i F.Crick**, prezentują DNA, jako helisę złożoną z dwóch nici powiązanych wiązaniami wodorowymi. Na podstawie obrazów dyfrakcji promieni X, dostarczonych przez **R. Franklin i M. Wilkinsa** oraz odkryć **E. Chargraffa**, udało się stworzyć model DNA.

W 1962 roku **J. D. Watson, F.Crick i M. Wilkins** otrzymują Nagrodę Nobla.

1956r, Dokładne zbadanie ludzkiego kariotypu i podanie właściwej liczby chromosomów ludzkich (46)
- Tijo i Levan

1958r, Beadle, E. Tatum i J. Lederberg otrzymują Nagrodę Nobla za ustalenie podstawowych prawideł rządzących genetyką bakterii i grzybów.

J. Lederberg zajmował się badaniem zjawiska koniugacji i transdukcji u bakterii,
Beadle, E. Tatum, jeszcze w 1941 byli autorami stwierdzenia jeden gen - jeden enzym.

1959r, Nagroda Nobla za prace dotyczące polimeryzacji kwasów nukleinowych dla **A. Kronenberga** i **S. Ochoa**.

Kronenberg, jako biochemik, zajmował się badaniem aktywności enzymów, w latach pięćdziesiątych skupił się na enzymach replikujących DNA - wyizolował polimerazę DNA I.

S. Ochoa, zajmował się enzymami wykorzystującymi energię z wysokoenergetycznych wiązań ATP.

1961r, **J. Monod**, **A. M. Lwoff** i **F. Jacob** przedstawiają operonowy model ekspresji genów prokariotycznych. Za swoje badania otrzymują Nagrodę Nobla w 1965 roku.

1968r, Nagroda Nobla dla R.W. Holleya, H.G. Khorana i M.W. Nirenberga za ustalenie podstaw kodowania informacji genetycznej (rozszyfrowanie kodu genetycznego).

M.W. Nirenberg odkrył, że w ekstrakcie komórek *E. coli* może zachodzić synteza nowych białek po dodaniu mRNA. W 1961 roku udało mu się ustalić, że sekwencja UUU koduje fenyloalaninę.

H.G. Khorana, odkrył w jaki sposób można syntetyzować trójnukleotydowe fragmenty RNA o znanej sekwencji - pozwoliło to na rozszyfrowanie kodu genetycznego.

R.W. Holley - zajmował się badaniami nad tRNA, ustalił, że ma on strukturę *liścia koniczyny*.

1970r,

H.G. Khorana syntetyzuje pierwsze DNA
in vitro

1975r,

D. Baltimore, R. Dulbecco i H.M Temin
otrzymują Nagrodę Nobla za odkrycie
retrowirusów i odwrotnej transkryptazy
(enzymu, który może syntetyzować DNA na
matrycy RNA)

1977r

F. Sanger, Barrel i Maxam i W. Gilbert udoskonalają metody sekwencjonowania DNA,
F. Sanger i W. Gilbert (wraz z P. Bergiem) w 1980 roku dostają Nagrodę Nobla

Pierwszy sklonowany gen ludzki przez **J. Shine** (somatomammotropina sklonowana na plazmidzie bakteryjnym)

Itakurze udaje się uzyskać somatostatynę drogą inżynierii genetycznej

1983r

B. McClintock otrzymuje Nagrodę Nobla za odkrycie ruchomych elementów genetycznych - **transpozonów**. B. McClintock prowadziła swe badania jeszcze w latach czterdziestych. Badając kukurydzę zauważyła, że niektóre cechy dziedziczą się niezgodnie z prawami Mendla.

K. Mullis przedstawia założenia metody PCR. Obecnie jest to podstawowa metoda używana w badaniach naukowych i analizach klinicznych. K. Mullis dostał Nagrodę Nobla w dziesięć lat po swoim odkryciu.

1990r,

Pierwsza kliniczna próba terapii genowej.
Leczenie SCID przez (ciężki, złożony niedobór immunologiczny) przez wprowadzenie prawidłowej kopii genu ADA (deaminaza adenozyne).

1993r,

Nagroda Nobla za odkrycie genów podzielonych (pokazano, że w genach znajdują się regiony kodujące - eksony i niekodujące - introny). Nagrodę otrzymali **P. Sharp i R. Roberts.**

1996r,

Ian Wilmut sklonowanie owcy Dolly

2001r,

Craig Venter odczytanie 95% DNA u pięciu osób - obu płci i różnych ras.

Jose B. Cibelli, Robert P. Lanza i Michael D. West - sklonowanie ludzkich zarodków.

Biotechnologia i inżynieria genetyczna

Biotechnologia - zespół technologii , służących do wytwarzania użytecznych , żywych organizmów lub substancji pochodzących z organizmów lub ich części. Inaczej - wszelkie manipulacje żywymi organizmami prowadzące do osiągnięcia określonych korzyści.

"Biotechnologia to zintegrowane zastosowanie wiedzy i techniki w dziedzinie biochemii , mikrobiologii i nauk inżynierskich w celu technologicznego wykorzystania zdolności drobnoustrojów , kultur tkankowych lub części z nich."

Inżynieria genetyczna - zespół technik badawczych pozwalający na wyizolowanie i charakterystykę określonych genów , a także wprowadzenie do nich zmian.

Odkrycie dwóch typów enzymów przyczyniło się w dużej mierze do rozwinięcia technik klonowania DNA.

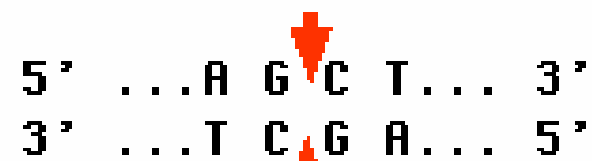
Pierwszy z nich to **enzymy restrykcyjne** - tnące DNA każdego organizmu na powtarzalny komplet fragmentów. Drugi typ to **ligazy** - enzymy trwale łączące pocięte fragmenty z samoreplikującymi się cząsteczkami DNA tzw. wektorami.

Pozwala to na produkowanie zrekombinowanego DNA. Może on być włączany do odpowiednich komórek - komórek gospodarza.

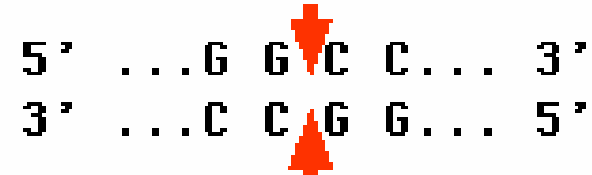
RESTRYKTAZY - tną DNA tworząc powtarzalny komplet fragmentów.

Enzymy restrykcyjne i sekwencje przez nie rozpoznawane			
Organizm	Nazwa enzymu	Sekwencja rozpoznawana	Uwagi
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	5' ... G G <u>C C</u> ... 3' 3' ... C C <u>G G</u> ... 5'	Powstają tępe końce
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	5' ... T <u>C G A</u> ... 3' 3' ... A G C <u>T</u> ... 5'	5' jest lepkiem końcem
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>HhaI</i>	5' ... G C G <u>C</u> ... 3' 3' ... C <u>G C</u> G ... 5'	3' jest lepkiem końcem
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>DdeI</i>	5' ... C <u>T N A G</u> ... 3' 3' ... G A N <u>T C</u> ... 5'	Gdzie "N" jest dowolną puryną lub pirymidyną
<i>Moraxella bovis</i>	<i>MboII</i>	5' ... G A A G A (N) ₂ ... 3' 3' ... C T T C T (N) ₁ ... 5'	Enzym tnę poza sekwencją rozpoznawaną
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRV</i>	5' ... G A T A T C ... 3' 3' ... C G A T A G ... 5'	Powstają tępe końce
	<i>EcoRI</i>	5' ... G <u>A A T T C</u> ... 3' 3' ... C T T A A <u>G</u> ... 5'	5' jest lepkiem końcem
<i>Providencia stuarti</i>	<i>PstI</i>	5' ... C T G C A <u>G</u> ... 3' 3' ... G A <u>C G T C</u> ... 5'	3' jest lepkiem końcem
<i>Microcoleus</i>	<i>MstII</i>	5' ... C C T <u>N A G G</u> ... 3' 3' ... G G A N <u>T C C</u> ... 5'	Gdzie "N" jest dowolną puryną lub pirymidyną
<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	<i>NofI</i>	5' ... G C <u>G G C C G C</u> ... 3' 3' ... C G C C G G <u>C G</u> ... 5'	Rzadko tnący enzym, rozpoznający 8-nukleotydową sekwencję

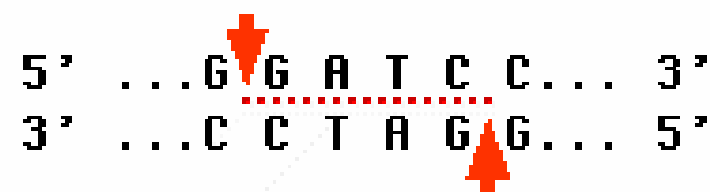
AluI



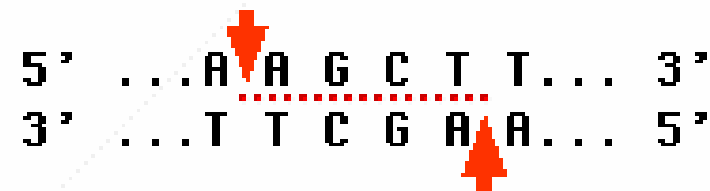
HaeIII



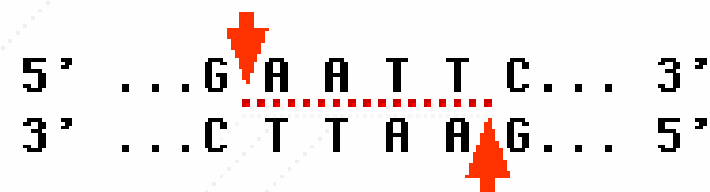
BamHI



HindIII



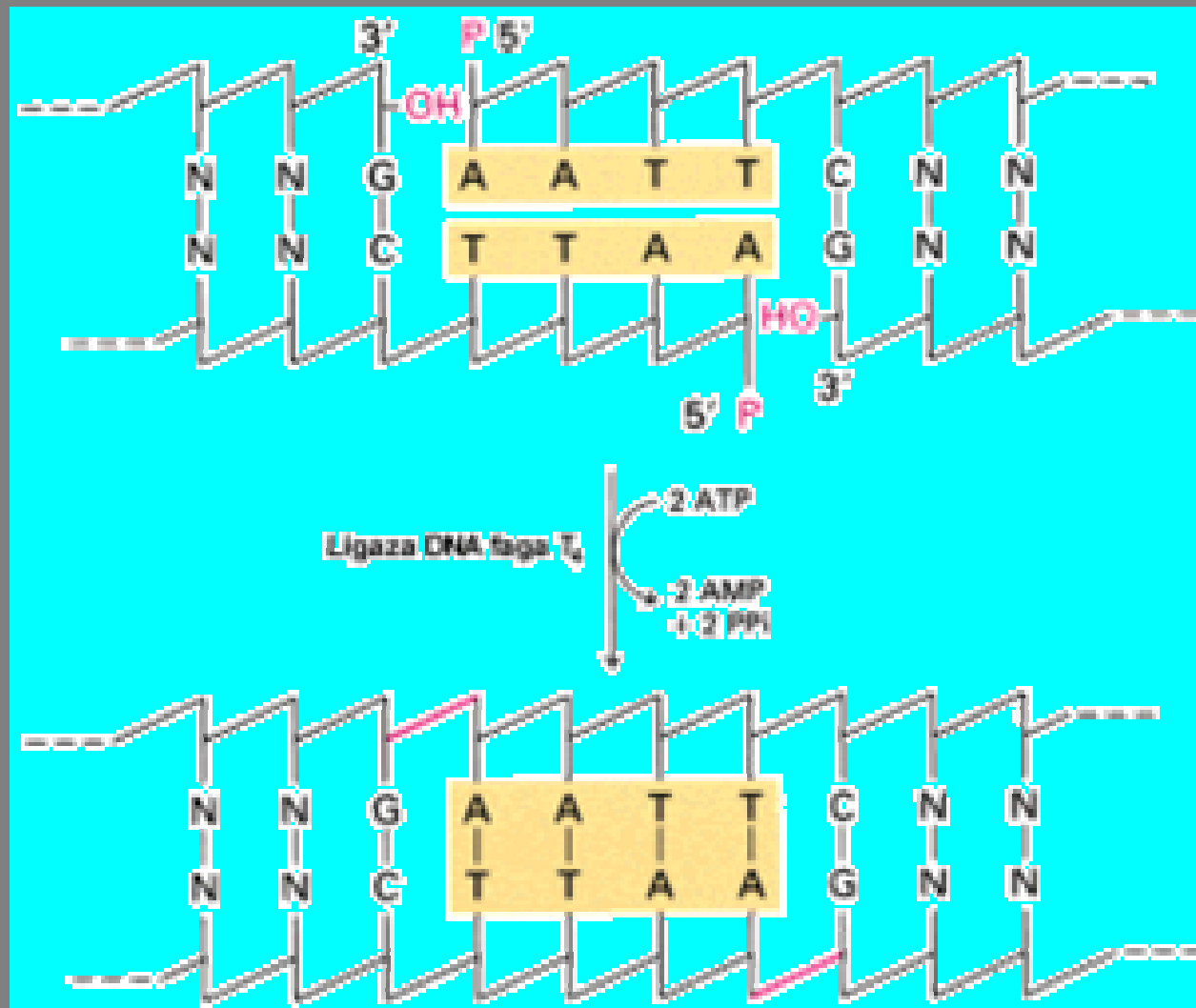
EcoRI



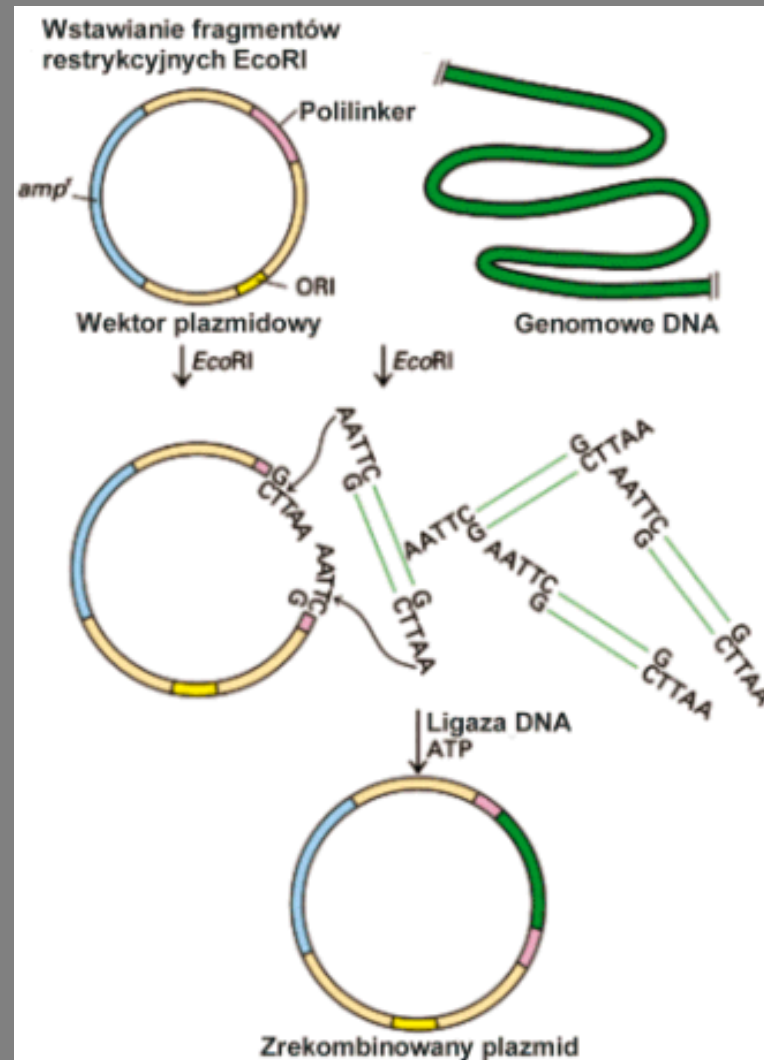
AluI and **HaeIII** produce blunt ends

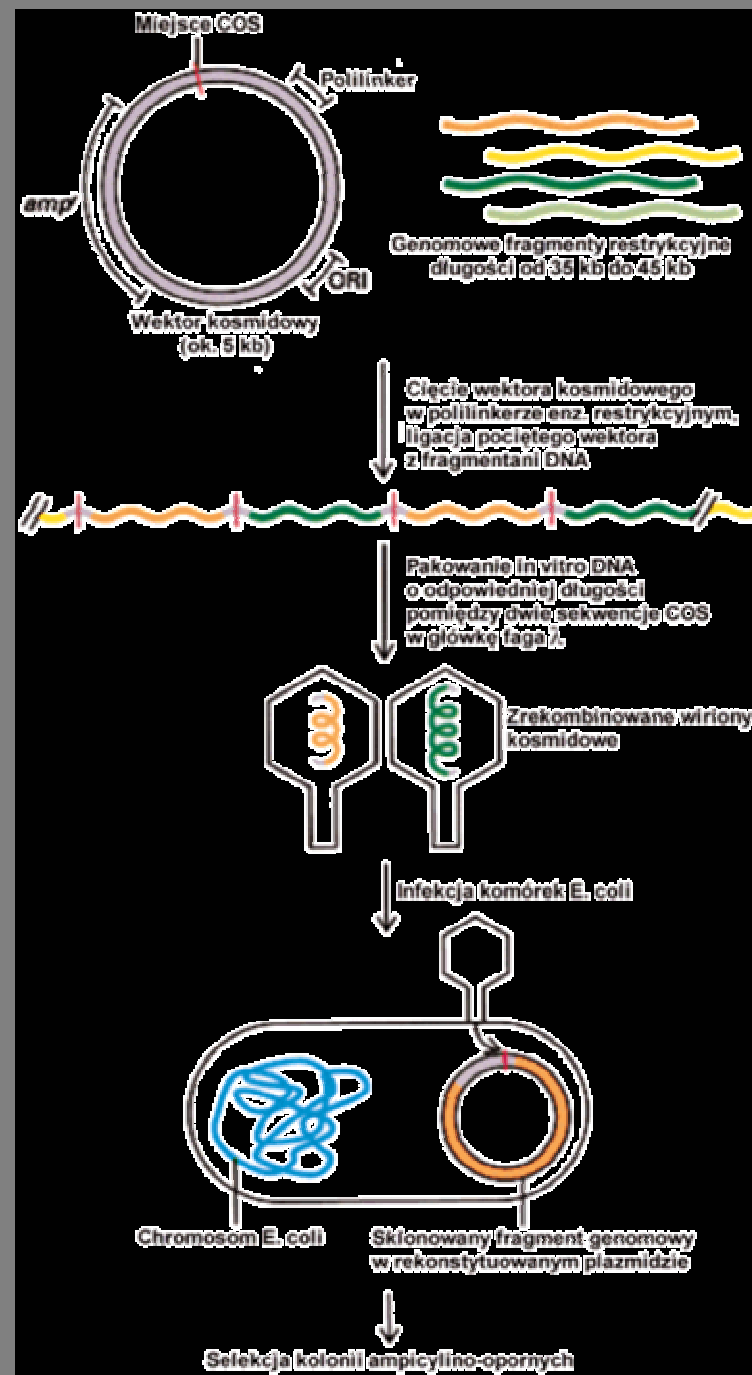
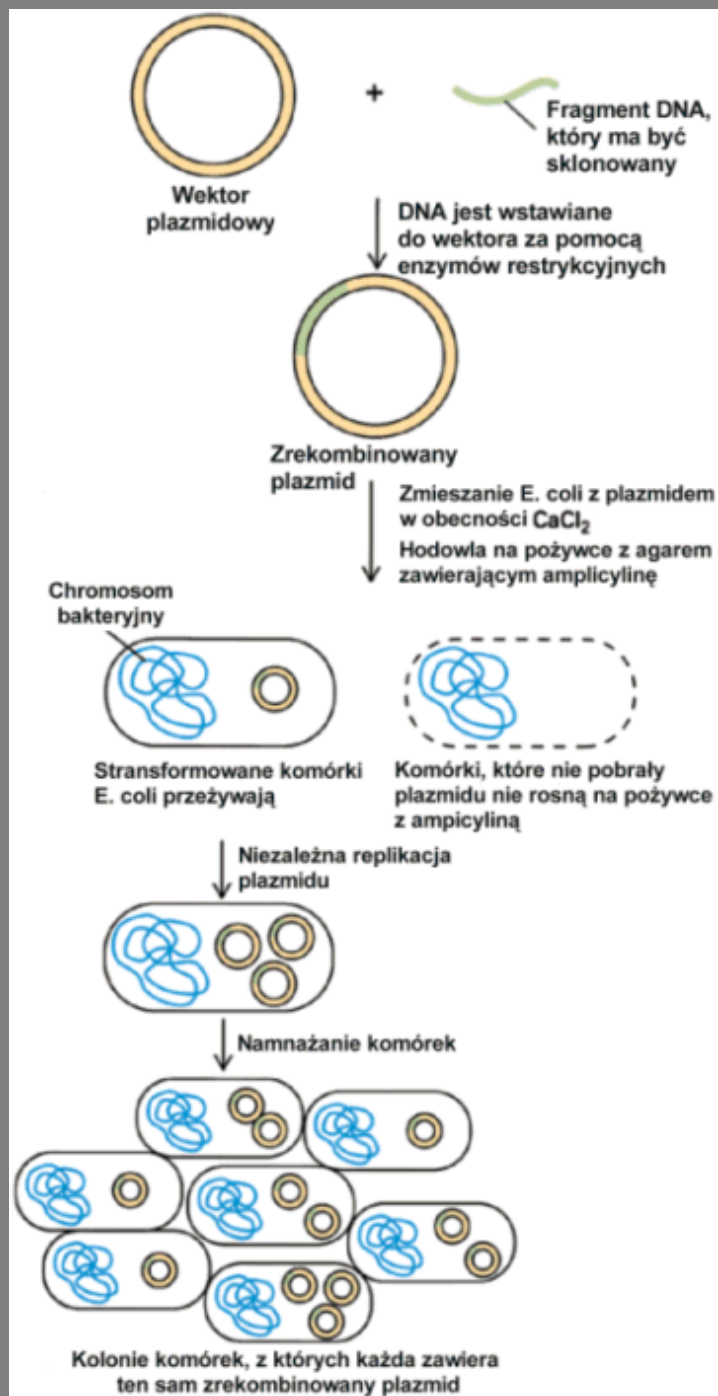
BamHI **HindIII** and **EcoRI** produce "sticky" ends

Ligazy - enzymy trwale łączące pocięte fragmenty z samoreplikującymi się cząsteczkami DNA tzw. wektorami.

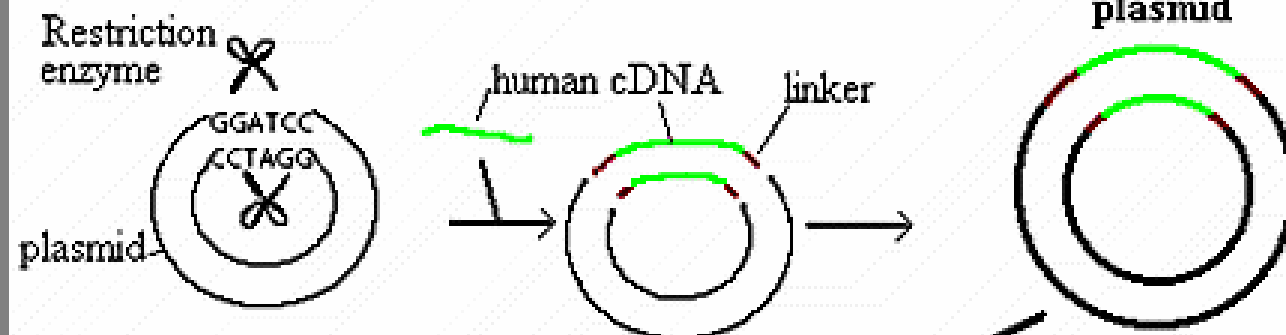


WEKTOR - cząsteczka DNA mogąca być nośnikiem interesującego nas kawałka DNA, która posiada zdolność do autonomicznej replikacji w danym typie komórek.

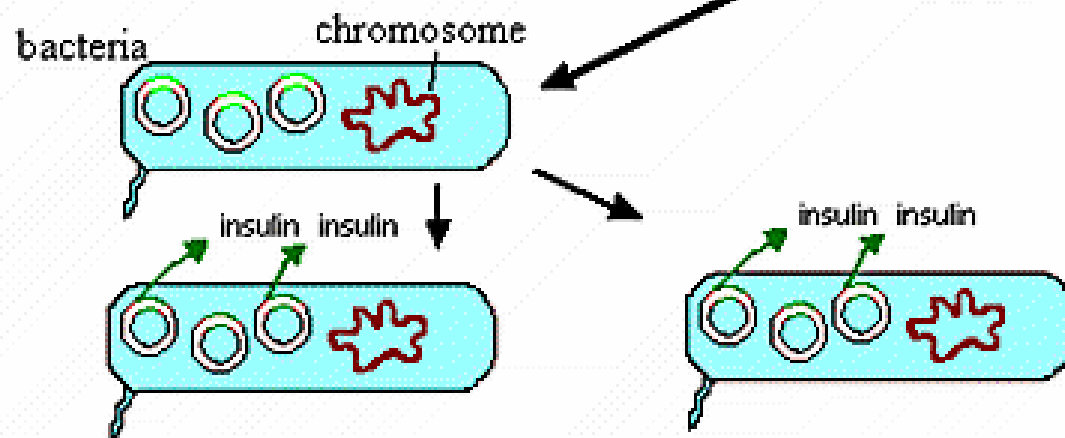




Transfer of the Insulin gene



Cloning the Insulin Gene



Transfer and cloning of the Insulin gene

Zmodyfikowane genetycznie
wirusy i bakterie

Zmodyfikowane wirusy:

- szczepionki,
- wektory dla wprowadzania genów do bakterii, terapii genowych

Zmodyfikowane bakterie:

- szczepionki bakteryjne
- wytwarzające ludzkie białka - insulina, somatotropina
- rozkładające zanieczyszczenia ropopochodne

Szczepionki

- Szczepionki zawierające żywe **atenuowane drobnoustroje** (atenuacja przez wprowadzenie do genomu ściśle określonych mutacji delecyjnych).

Np.. szczepionki przeciwko *Salmonella typhi*.

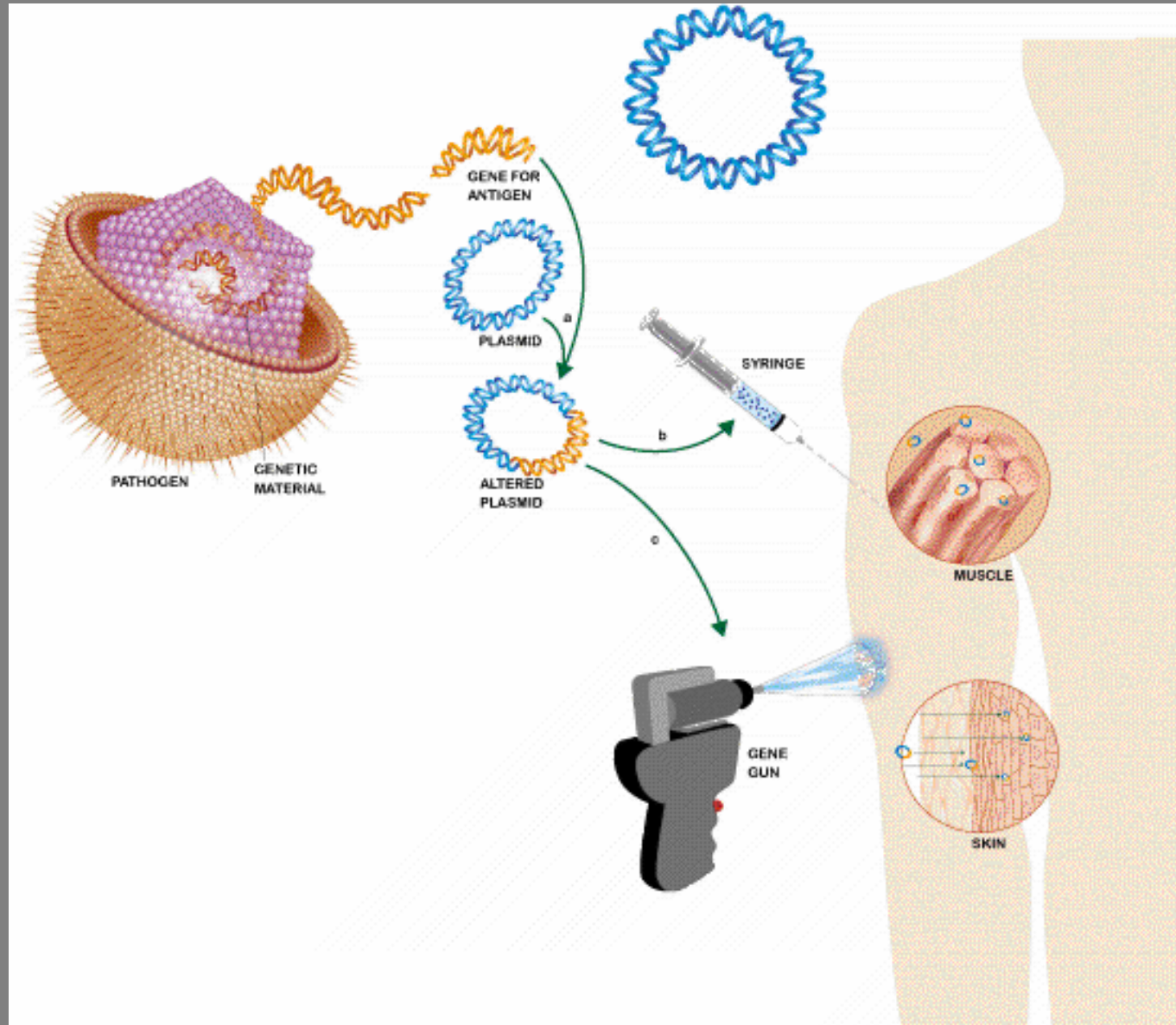
- **Szczepionki podjednostkowe**

fragment genu *Clostridium tetani* kodujący domenę toksyny odpowiedzialną za jej immunogenność sklonowano w komórkach *E.coli*

- szczepionka przeciwko wirusowi żółtaczki *Hepatitis B* produkowana w komórkach drożdży dzięki ekspresji antygeny otoczki wirusowej

Szczepionki tzw. III generacji :

- podanie czystego genu - "nagie" szczepionki.
- wstrzyknięcie do mięśni szkieletowych DNA wirusa grypy w formie plazmidu indukuje powstanie specyficznych cytotoksycznych limfocytów T.



Transgeniczne rośliny i zwierzęta

Organizm transgeniczny - organizm wyższy , do genomu którego wprowadzono nowy gen , heterologiczny (z innego organizmu) w taki sposób , aby znalazł się on zarówno w komórkach somatycznych jak i komórkach pasma płciowego dzięki czemu podlega dziedziczeniu. Jest to trwała modyfikacja genetyczna.

Transgeniczne rośliny

Transgeniczne rośliny:

Naturalny system wprowadzania DNA - plazmidy *Agrobacterium* jako wektory DNA dla roślin dwuliściennych.

Bezwektorowa transfekcja komórek roślinnych

- elektroporacja
- mikroiniekcja
- zastosowanie "armatki genowej"
 - wstrzeliwanie drobnych kuleczek wolframowych opłaszczonych DNA



Zwiększanie trwałości roślin dzięki ingerencji w ich metabolizm np. stworzenie niegniącego pomidora poprzez wykorzystanie strategii antysensu tzn. transformacja antysensownym RNA . -

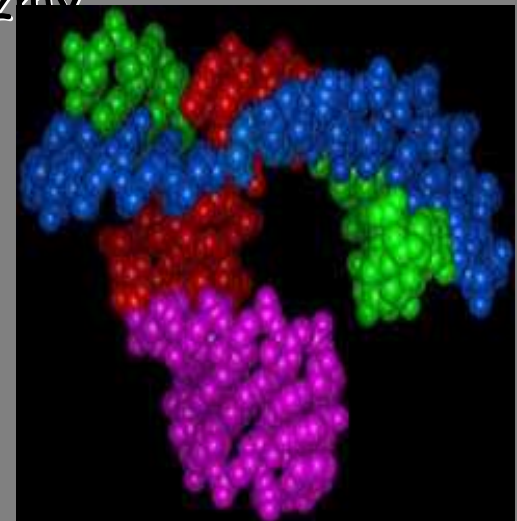
Antysensowne oligonukleotydy - krótkie odcinki jednoniciowego DNA lub RNA komplementarne do specyficznych sekwencji genu.

- ✓ oligonukleotydy bez właściwości katalitycznych
- ✓ oligonukleotydy o własnościach katalitycznych (rybozymy)

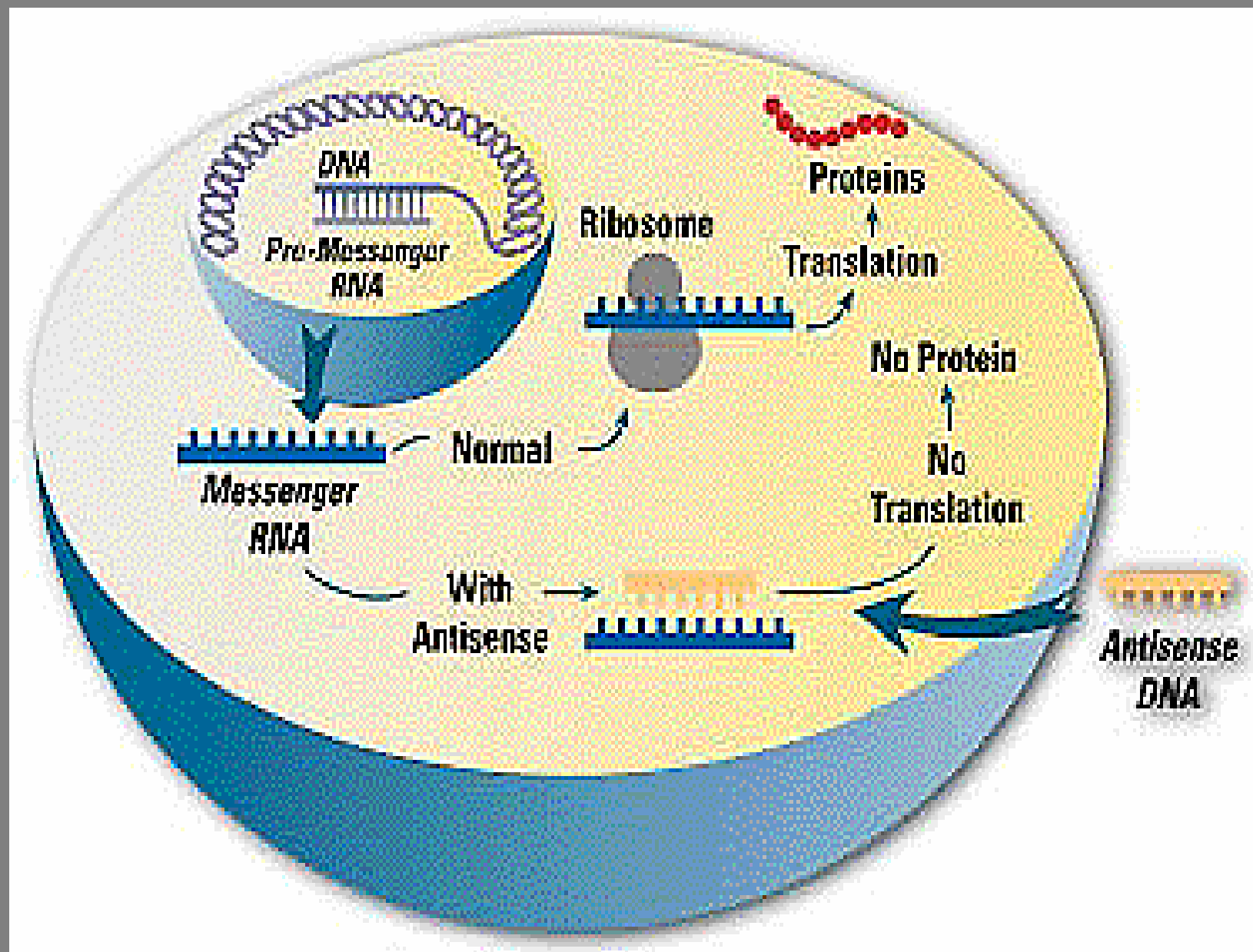
Mechanizm działania:

- ✓ hamowanie transkrypcji przez tworzenie trójniciowej struktury z DNA
- ✓ hamowanie procesu dojrzewania mRNA
- ✓ hamowanie transportu mRNA z jądra do cytoplazmy
- ✓ przyspieszenie degradacji mRNA
- ✓ blokowanie inicjacji translacji

Rybozym



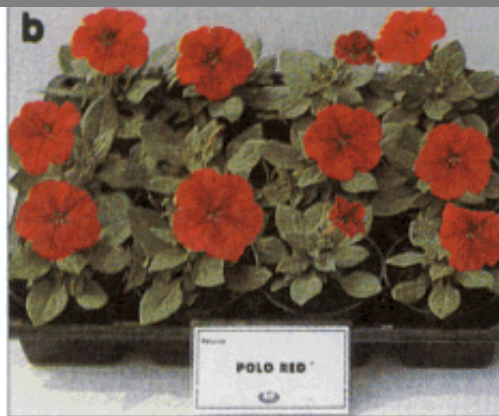
Zasada działania antysensownego DNA



Wprowadza się do genomu gen natywny dodatkowy , zamiast wzmożonej ekspresji obserwuje się efekt odwrotny aż do wygaszenia. Uzyskano w ten sposób niewiędnące goździki.



Uzyskanie nowych odmian - nowych kolorów ,
kształtów , właściwości wzrostu np. roślin
ozdobnych m.in. pomarańczowe petunie
(transformacja z udziałem *Agrobacterium*
genem ze szlaku produkcji antocyjaniny z
kukurydzy) czy przekształcenie ziemniaka w
roślinę ozdobną.

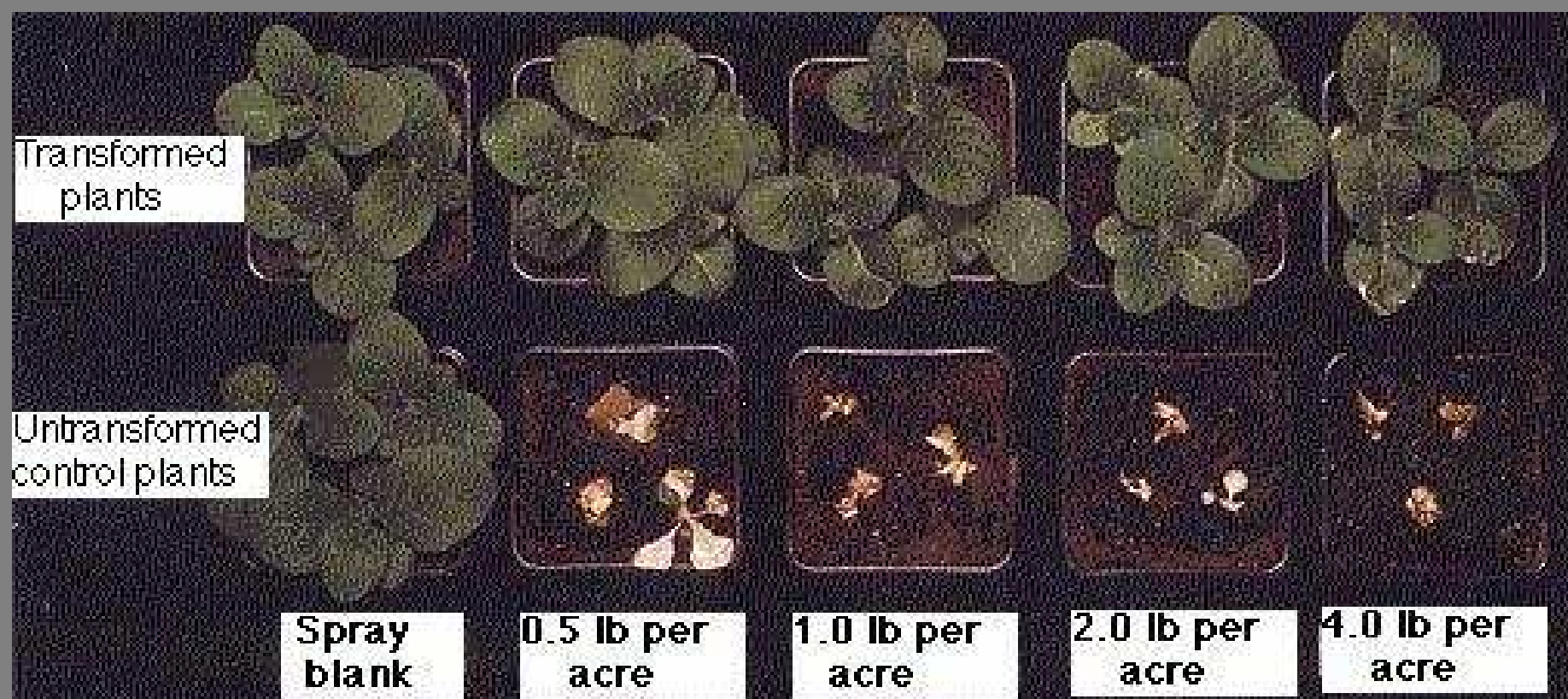


- Wykorzystanie roślin jako bioreaktorów do produkcji białek heterologicznych. W ten sposób produkowane są interleukiny , cytokiny , hormony wzrostu , przeciwciała. (niski koszt, duża ilość białka)

- Uodpornienie roślin na infekcje co daje zwiększone plony , lepszy wzrost i wyższą jakość poprzez zainfekowanie ich szczepem wirusowym powodującym łagodniejszy efekt chroni przed infekcją przez bardziej zjadliwy szczep lub transgenizacja genami kodującymi białko płaszcza danego wirusa np. wirusa mozaiki tytoniowej.

Ochrona przed owadami np. dzięki ekspresji toksyny bakteryjnej *Bacillus thuringiensis* chroniona jest bawełna lub dzięki transgenicznej ekspresji inhibitora proteaz serynowych - tytoń.

Uodpornienie roślin na herbicydy (2,4D)



Ziemniaki Bt odporne na szkodniki (np. stonkę)



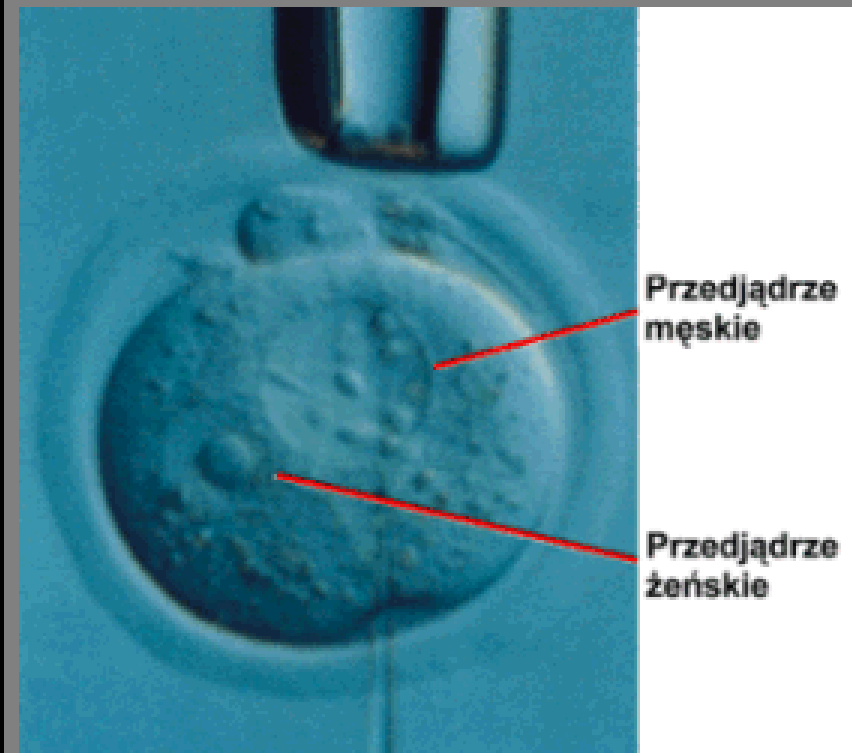
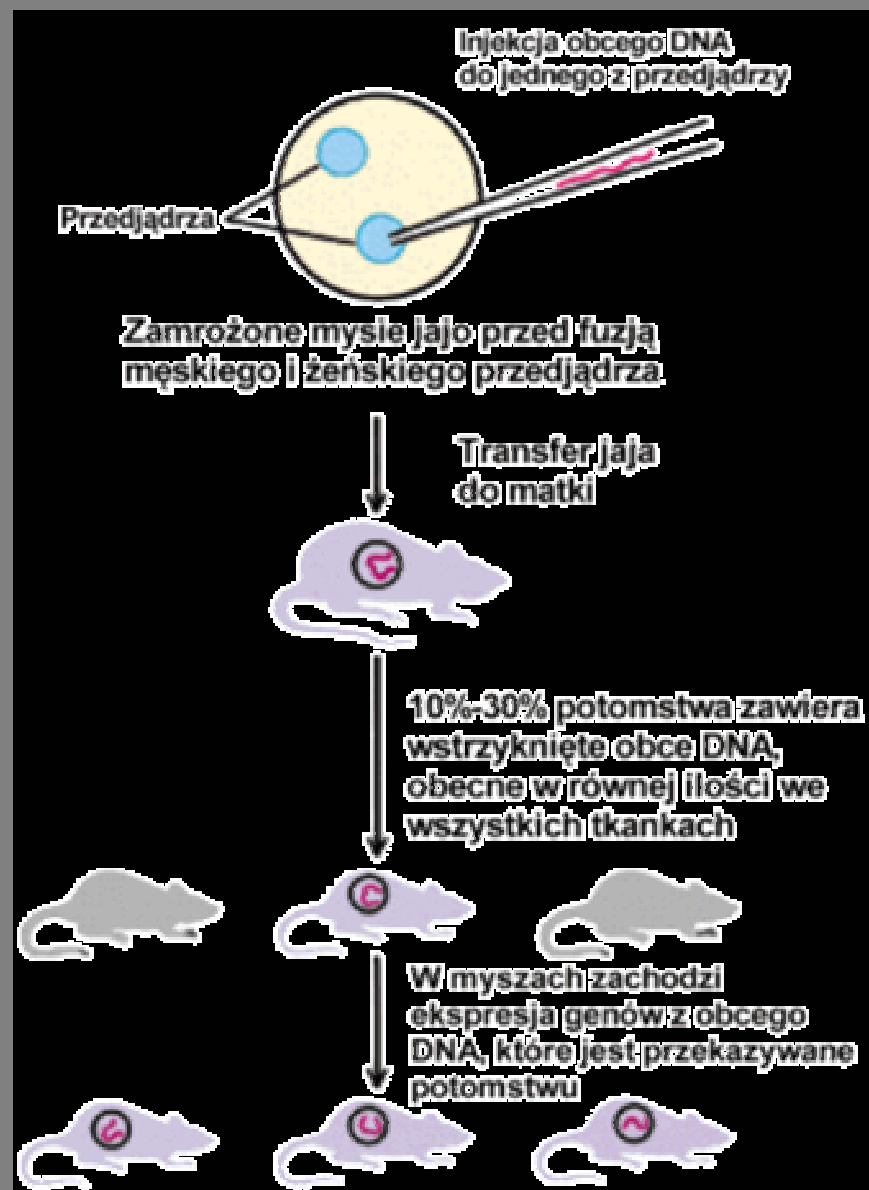
- zboża asymilujące azot z powietrza
- rośliny z genami antygenów wirusowych lub bakteryjnych - szczepionki
- rośliny odporne na mróz
- rośliny z genem fluorescencji - oświetlanie ulic

Transgeniczne zwierzęta

Transgeniczne zwierzęta to organizmy , które mają obcy DNA wbudowane trwale do komórek rozrodczych - komórek linii płciowej.

Uzyskuje się je:

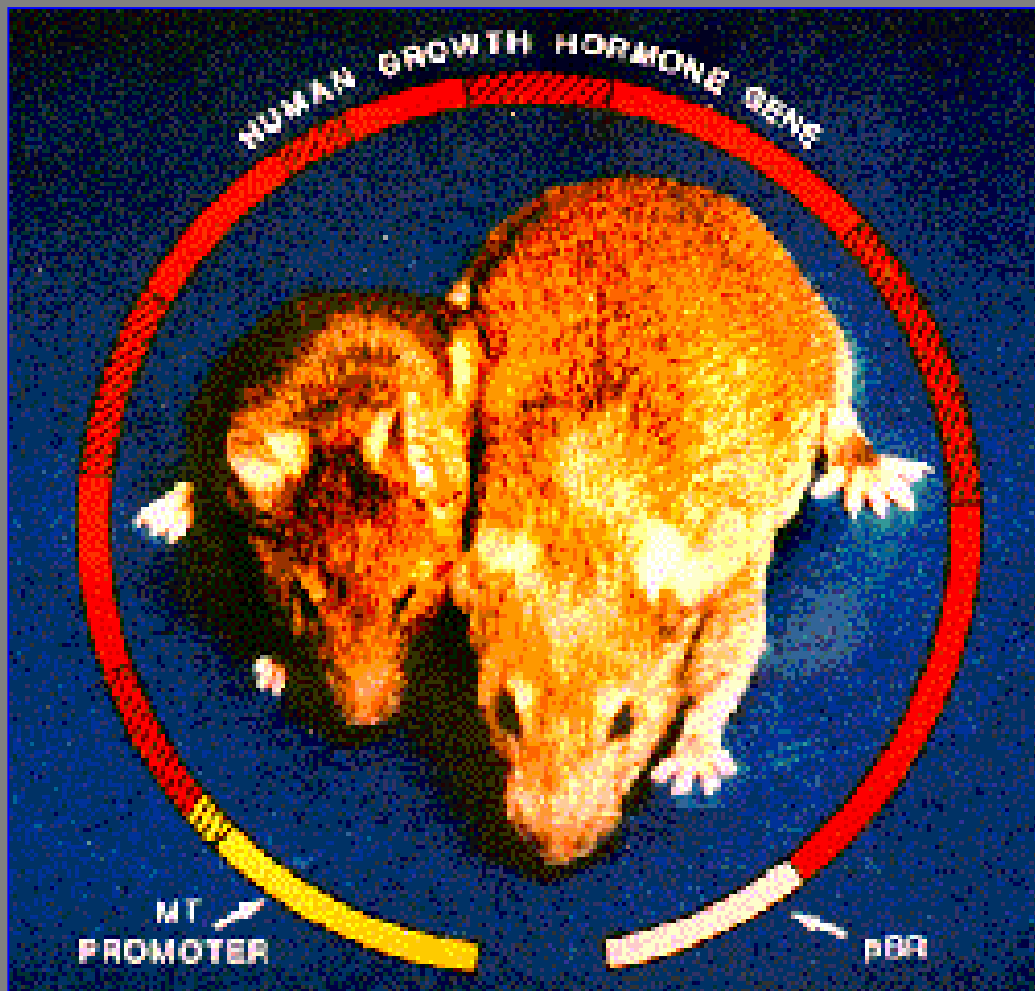
- dzięki mikroiniekcji *in vitro* DNA do jednego z przedjądrzy zapłodnionej komórki jajowej przed pierwszym jej podziałem ,
- przez infekcję wczesnego zarodka zrekombinowanym wektorem pochodzenia wirusowego ,
- poprzez modyfikację genetyczną pierwotnych komórek węzła zarodkowego i wprowadzenie ich do zarodka w stadium blastocysty, ponieważ komórki węzła zarodkowego są zdolne do różnicowania się we wszystkie typy komórek,





Transgenic Mice

Pierwszym zwierzęciem transgenicznym była mysz z genem hormonu wzrostu szczura.





POLLY (z lewej) jest transgenicznym klonem rasy Poll Dorset z wprowadzonym ludzkim genem czynnika IX.

Klonowanie zarodków ssaków

Klonowanie zarodków ssaków.

Dzięki temu możliwe jest uzyskanie wielu identycznych osobników. Wzbudza to ogromne zainteresowanie m.in. hodowców mających nadzieje na stworzenie jak największej liczby zwierząt o pożądanых cechach.



1. Metoda izolacji blastomerów.
2. Metoda agregacji blastomerów.
3. Metoda podziału zarodków.
4. Metodą transplantacji jąder komórek zarodkowych.

Metoda izolacji blastomerów.

W miarę kolejnych podziałów zygoty powstaje wiele komórek potomnych - blastomerów. Początkowo każdy z nich jest taki sam i teoretycznie posiada możliwość utworzenia wszystkich pozostałych komórek. Znaczący to, że w tym stadium z każdego blastomeru może powstać cały organizm. Doświadczalnie zostało to potwierdzone dla stadium nie przekraczającego ośmiu blastomerów. Jest to także uzależnione od gatunku.

Metoda transplantacji jąder komórek zarodkowych.

Jest to jedyna metoda pozwalająca na uzyskanie klonów liczących większą liczbę osobników. Usuwane są oba przedjądrza zygoty lub chromosomy z nie zapłodnionych oocytów a następnie wprowadzane są na ich miejsce jądra z blastomerów zarodków. Wprowadzenie uzyskuje się różnymi metodami : mikrochirurgiczną transplantacją , metodą fuzji komórkowych czego odmianą jest elektrofuzja itd.



**Zastępcza matka (*pośrodku*)
otoczona klonami dawcy jądra.**

1951 - Pierwsze udane przeniesienie embrionu z macicy jednej krowy do innej;

1952 - Klonowanie żab z komórek kijanek;

1970 - Sklonowanie mysich embrionów;

1979 - Sklonowanie owczych embrionów;

1980 - Sklonowanie krowich embrionów;

1984 - Australijka o imieniu Zoe urodziła się z zamrożonego embrionu;

Marzec 1996 - Ian Wilmut z Roslin Institute w Edynburgu (Wielka Brytania) ogłasza, że otrzymał pięć owieczek sklonowanych przez podział dziewięciodniowego zarodka. Trzy owce wkrótce po porodzie z niewyjaśnionych przyczyn zdechły. Dwie pozostałe - **Megan i Morag** w kwietniu 1997 zaszły w ciążę. Naukowcy z dumą podkreślają, że do zapłodnienia doszło w sposób naturalny;



Megan i Morag sklonowane przez podział dziewięciodniowego zarodka

5 lipca 1996 Ianowi Wilmutowi urodziła się Dolly – pierwsza owca sklonowana z komórki pobranej z dorosłego organizmu;



Dolly z poczętym naturalnie
jagnięciem

Procedura klonowania Dolly :

- pobranie jądra komórkowego z komórki wymienia dorosłej owcy,
- połączenie tegoż jądra z pozbawioną uprzednio jądra komórką jajową (oocytem).
- wszczepienie tak spreparowanej komórki jajowej matce zastępczej.

-Dolly urodziła się za 277próbą

Dolly nie była klonem żadnej z trzech owiec użytych w tym eksperymencie, bowiem ma dwa genomy od dwóch różnych owiec A i B (jądrowy i mitochondrialny) oraz „matkę” zastępczą.

Lipiec 1997 - Także w Roslin Institute urodziły się Polly i Molly - dwie owce sklonowane z komórek zarodkowych z "wstawionym" dodatkowym genem, kierującym produkcją białka - leku dla chorych na hemofilię;

Sierpień 1997 - Naukowcy z Beaverton w USA sklonowali małpy, dzieląc ich ośmiokomórkowe embriony;

Styczeń 1998 - Richard Seed, biznesmen i ekscentryczny naukowiec (fizyk, który w latach 70. przekwalifikował się na biologię) z USA, ogłosił, że w ciągu półtora roku zamierza sklonować człowieka;

20 stycznia 1998 - Pierwszy raz pokazano George'a i Charliego - transgeniczne byczki sklonowane przez naukowców z Uniwersytetu Massachusetts (USA);

16 lutego 1998 w PPL Therapeutics (firmie współpracującej z Wilmutem) przyszedł na świat cielak sklonowany tą samą metodą co owca Dolly. Na pamiątkę tego, że urodził się w święto - Dzień Prezydenta, nazwano go Mr. Jefferson;

5 lipca 1998 w Japonii na świat przychodzą dwie sklonowane jałówki.



Sklonowany gaur (Bos gaur)



?

Klonowanie terapeutyczne

Proces klonowania terapeutycznego polega na wprowadzeniu jądra "dorosłej" komórki do "pustej" (pozbawionej własnego jądra) komórki jajowej. Taka hybryda może następnie stworzyć nowy zarodek identyczny genetycznie z dawcą jądra komórkowego.

Klonowanie terapeutyczne - po co?

Aby z powstałych zarodków pozyskiwać komórki macierzyste. Komórki te potrafią przekształcić się w dowolną tkankę organizmu, np. we włókna nerwowe, komórki krwi czy włókna mięśni.

Komórki macierzyste mogą stać się niewyczerpanym źródłem tkanek zastępczych. Początkowo niewielkie grupy komórek wszczepiano by do organizmu w celu naprawy uszkodzeń, np. po zawale serca. Docelowo z komórek macierzystych można by hodować całe narządy.

Komórki macierzyste - klonowanie
terapeutyczne

wątroba,

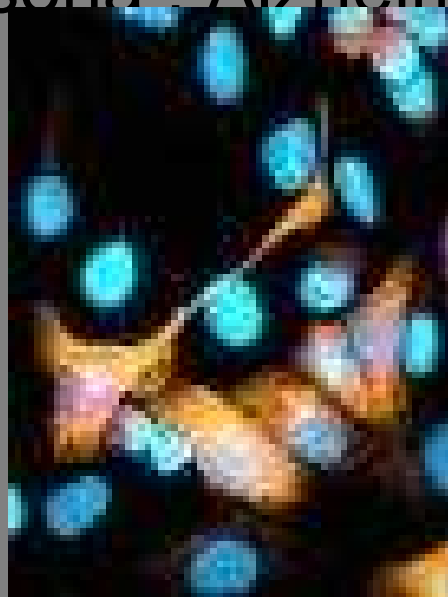
Krew (przeszczep szpiku,)

Siatkówka (retinopatie)

Mózg (choroba Parkinsona, Alzheimer)

Serce

skóra



Terapia genowa - metody, nadzieje i rzeczywistość



Terapia genowa

- ♣ korekcja defektu genetycznego przez wprowadzenie do komórek prawidłowego genu
- ♣ zmiana własności komórek przez wprowadzenie obcego genu
- ♣ regulacja ekspresji nieprawidłowego genu



Rodzaje terapii genowych:

Terapia genowa komórek płciowych

Terapia genowa zarodków

Terapia genowa komórek somatycznych

Terapia genowa komórek macierzystych (stem cells)

Terapia genowa in vivo

Terapia genowa ex vivo

Gene-therapy approaches

In-vivo approaches

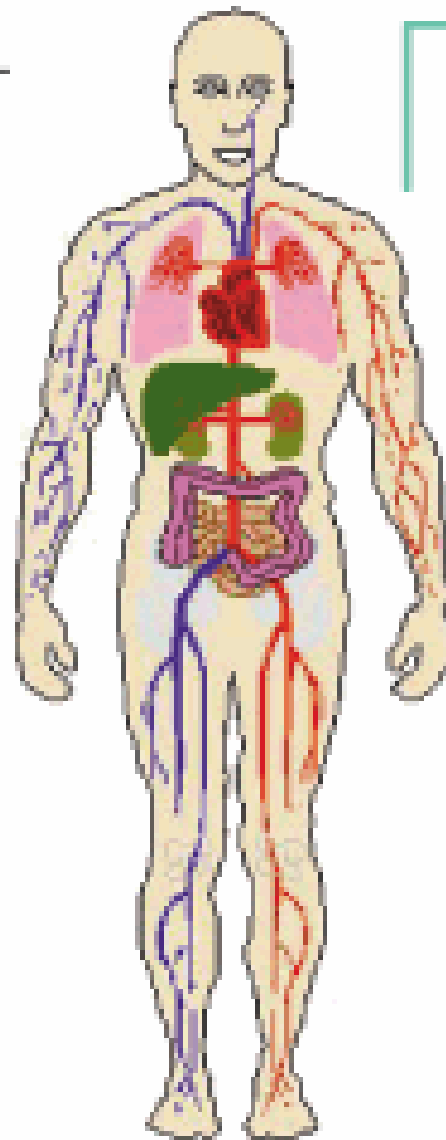


Intratumour
Intravenous
Intraperitoneal
Subcutaneous
Intramuscular
Intra-arterial



Airways
Lung

Ex-vivo approaches



Biopsy cells
Bone marrow
Dermis
Liver
Tumour

Quality
control

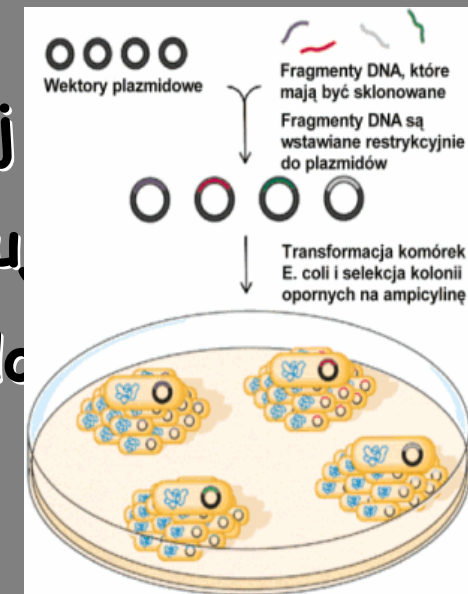
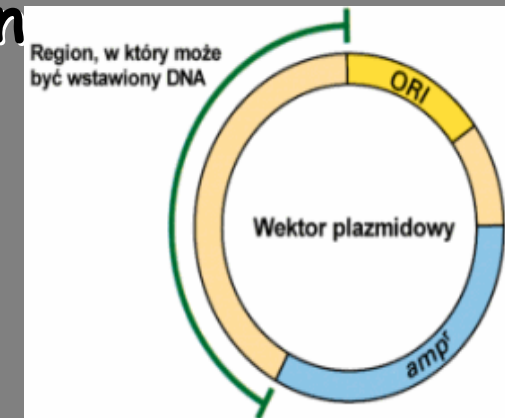
Grow
cells

Transduce cells
Retrovirus
DNA vector

Wektor - cząsteczka DNA (wirus, plazmid, chromosom) przenosząca leczniczy gen

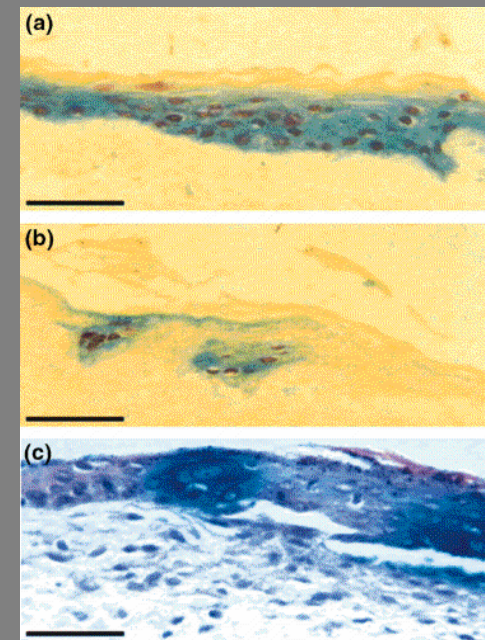
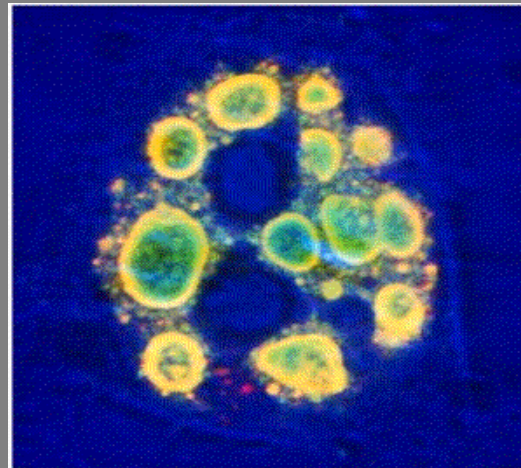
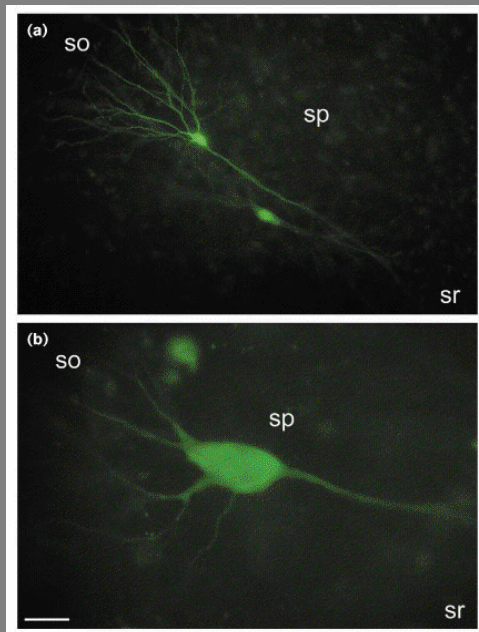
Cechy idealnego wektora genowego:

- wprowadza jeden lub więcej genów
- rozpoznaje komórki docelowe
- ulega ekspresji wyłącznie w komórkach docelowych
- nie wywołuje reakcji immunologicznej
- insercja wektora do DNA nie powoduje
- zachowuje stabilność w komórkach docelowych i potomnych
- łatwość syntezy



Uwidacznianie komórek po transfekcji przez wprowadzanie genu:

- lucyferazy
- białka zielonej fluorescencji
- beta-galaktozydazy



Niewirusowe techniki transferu DNA

- transfekcja z użyciem jonów wapnia
- mikroinjekcja
- elektroporacja
- liposomy
- iniekcja plazmidowego DNA
- bombardowanie cząsteczkami DNA (gene-gun transfer)
- wprowadzanie sztucznych chromosomów
- wektory biochemiczne - połączenia DNA z białkami

Gene-gun transfer, ballistic DNA injection, particle bombardement

DNA plazmidowe jest precypitowane na cząsteczkach złota o wielkości 1-3 mikronów. Cząsteczki te wprowadzane są do komórek przy zastosowaniu urządzeń wykorzystujących pulsy prądu o wysokim napięcia lub ciśnienie helu.

Zastosowania:

- * wprowadzanie DNA do komórek skóry, wątroby i mięśni.
- * immunizacja przy pomocy szczepionek DNA wprowadzanych do mięśni (HIV, Hepatitis B,C, HSV, papilloma, influenza, ch. Lyme , Helicobacter pylori, malaria).

Pistolety genowe (gen guns)



Liposomy - lipidy reagujące elektrostatycznie z ujemnie naładowanym DNA tworząc stałe kompleksy

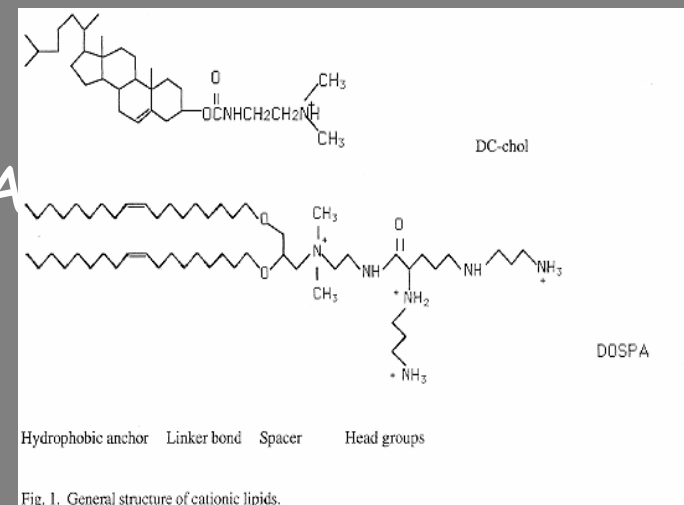
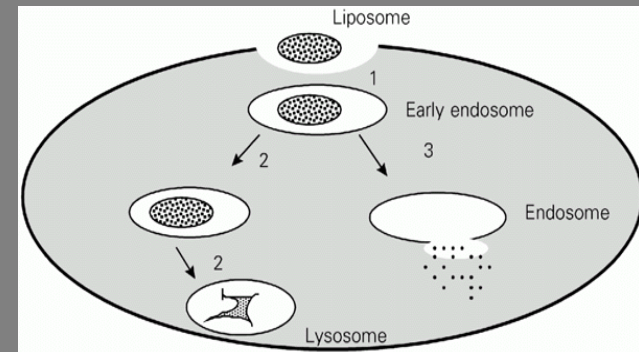
- Kationowe
- pH-wrażliwe

- chronią DNA przed degradacją
- wprowadzają duże cząsteczki DNA
- nie są immunogenne
- nie powodują ryzyka zakażenia

kompetentnym wirusem

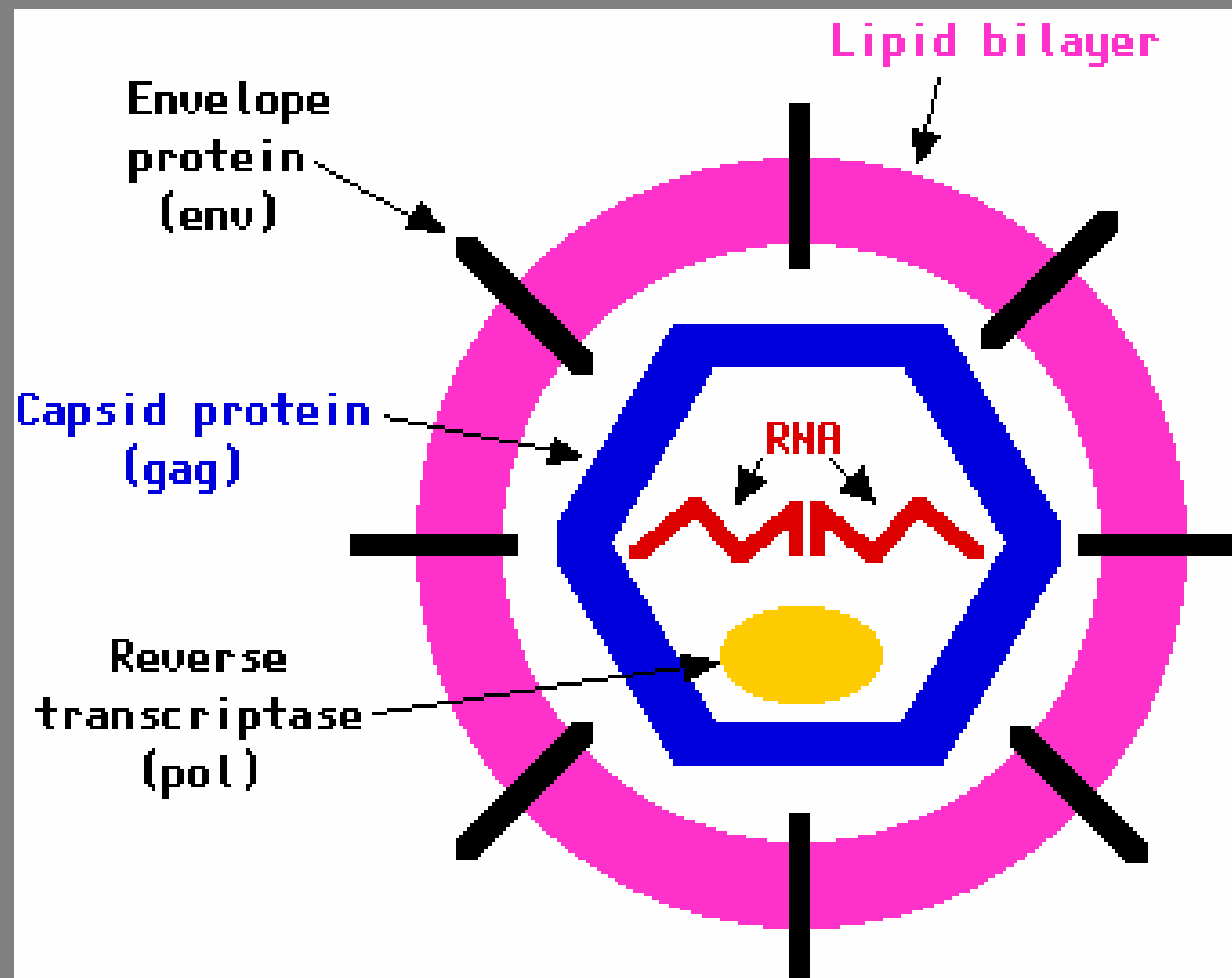
Lipofektyna : - N-[1-(2,3-dioleoyl)propyl]-N,N,N-trimetylo

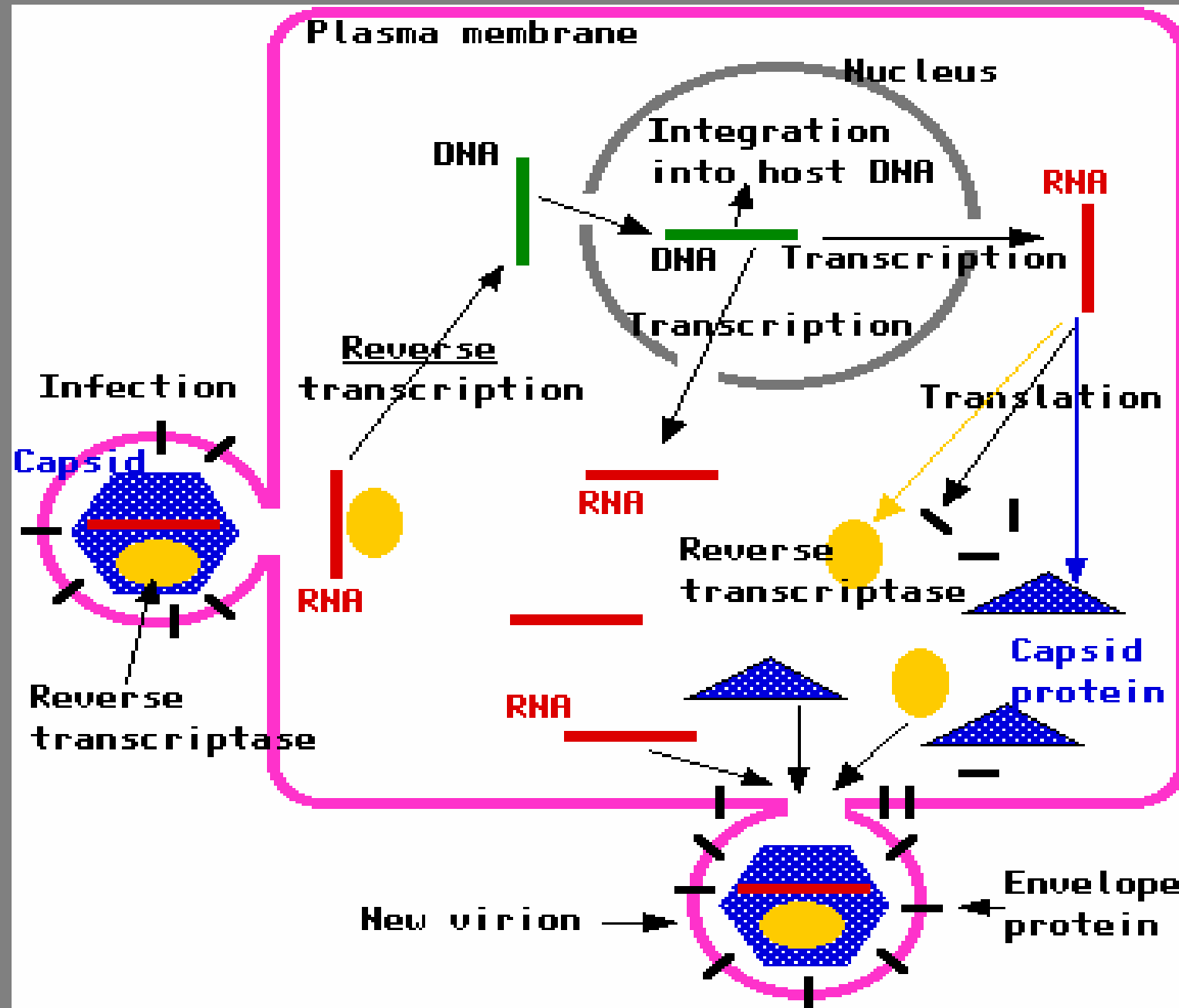
- dioleoyl fosfatydyloetanolamina (DOPE)

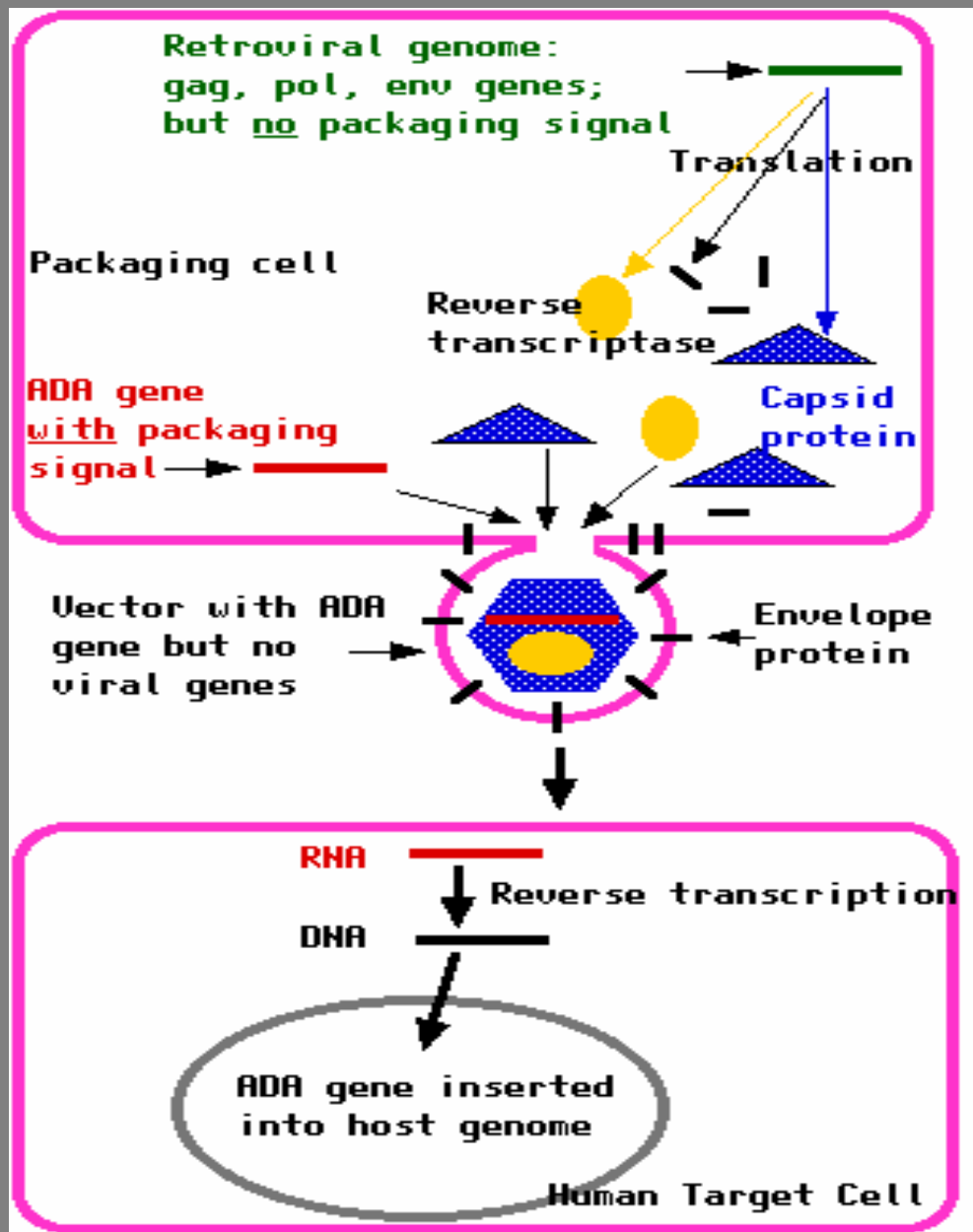


Wirusowe techniki transferu DNA

- wektory retrowirusowe (HIV, MLV).
- wektory adenowirusowe
- adeno-associated viruses (AAV)
- wektory z wirusa opryszczki (HSV)
- wektory z wirusa Vaccinia
- wektory z wirusa Sendai







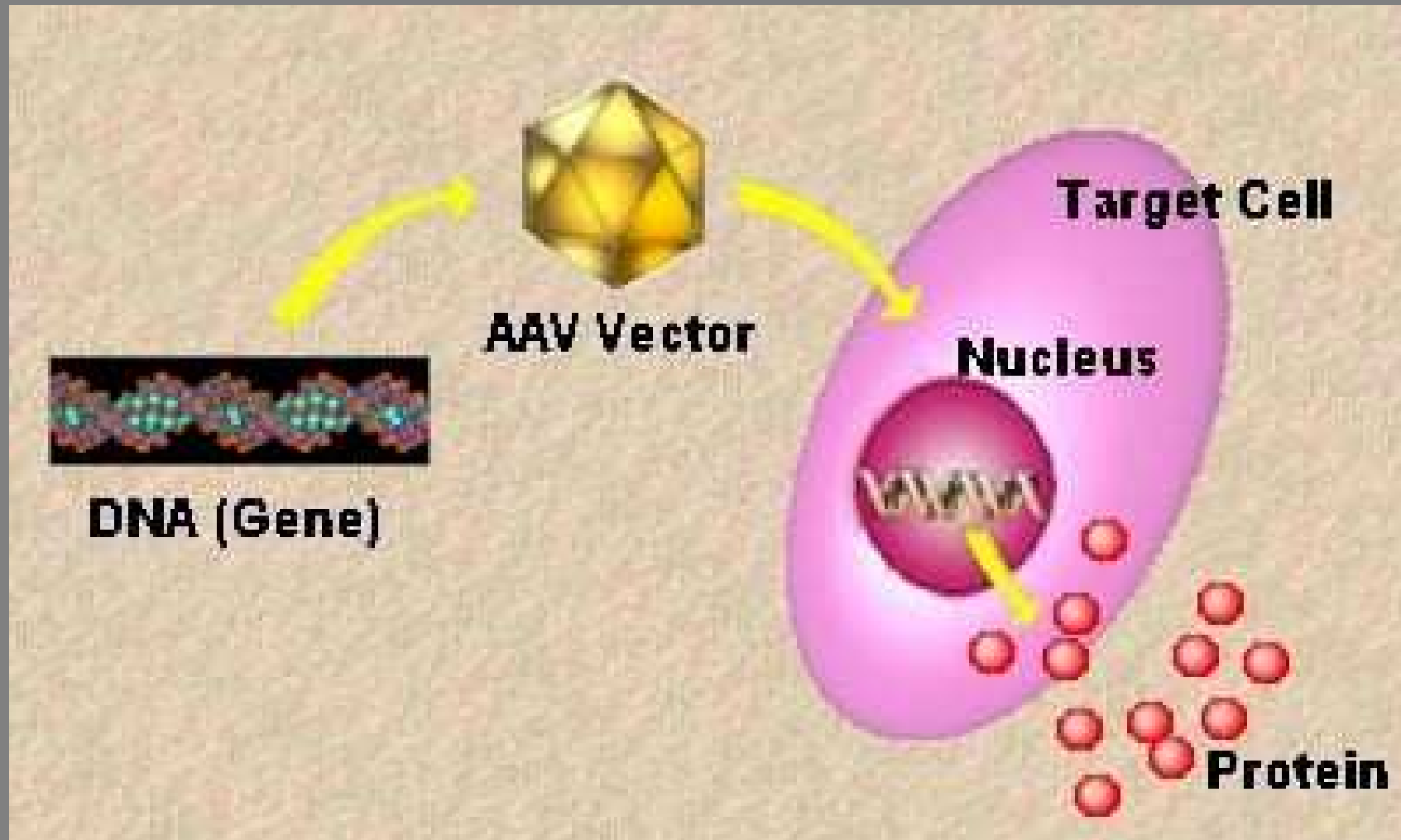
Prawidłowy wirus

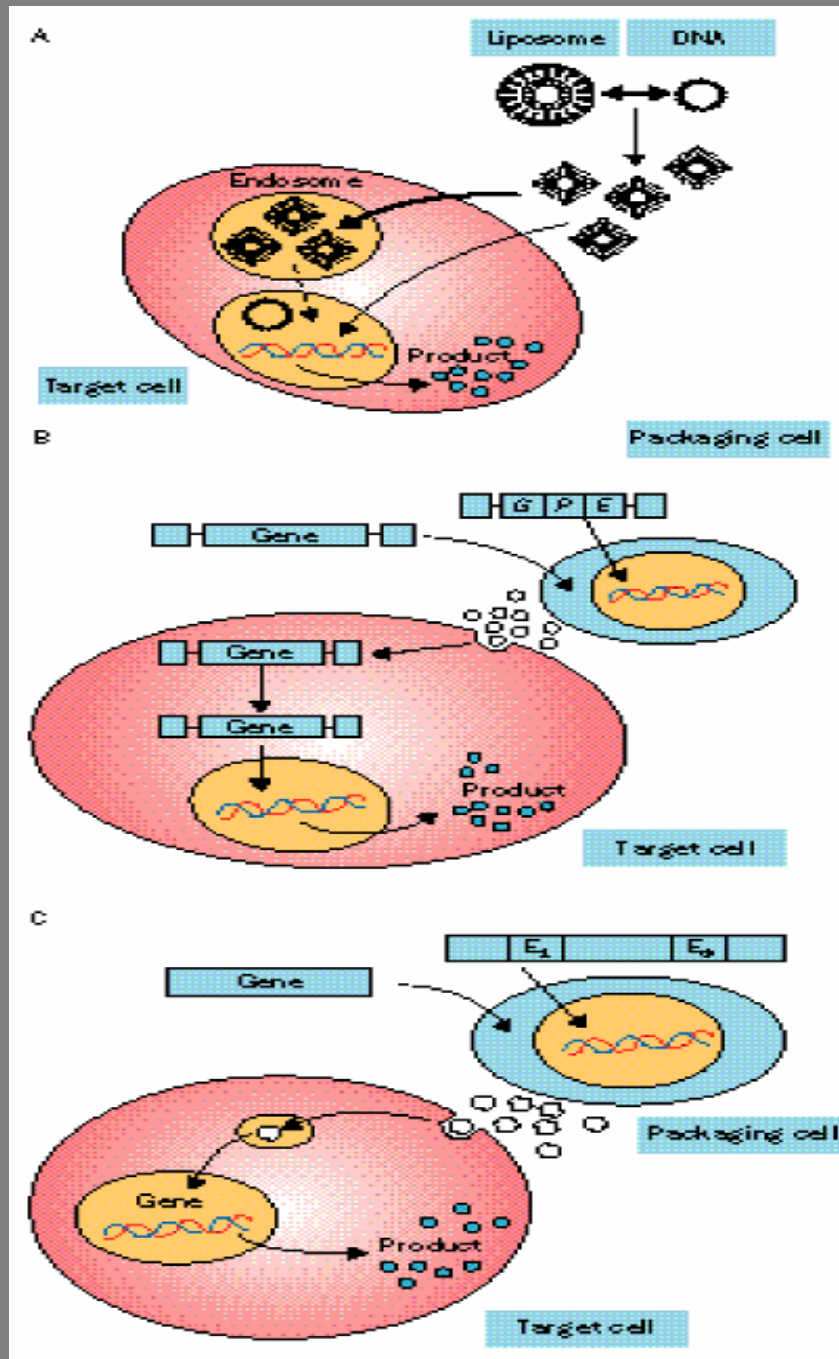


Zrekombinowane wirusy



Transfer przy użyciu Adenoma associated virus (AAV)





A. Liposomy

- >20kb (+) - nieimmunogenne
- nie powodują chorób
- (-) - mała skuteczność transferu
- nietrwała ekspresja

B. Retrowirusy

- 8-10kb (+) - integracja do genomu
- stabilna ekspresja
- (-) - wymagają komórek dzielących się
- losowość integracji → mutacje

c. Adenowirusy

- 8 - 35 kb (+) - nie powoduje poważnych chorób
- nie wymagają komórek dzielących się
- (-) - brak integracji
- immunogenność

Współczesne zastosowania terapii genowej:

- Terapia dziedzicznych chorób jednogenowych:
 - niedobory odporności (ADA-SCID, sprzężona z X-SCID)
 - dystrofie mięśniowe
 - mukowiscydoza (cystic fibrosis)
 - hemophilia B
 - cukrzyca typu I
 - choroby metaboliczne (fenyloketonuria, hipercholesterolemia etc.)
 - choroby spichrzeniowe (mukopolysacharydozy, ch. Gauchera,)
- Terapia dziedzicznych chorób wieloczynnikowych:
 - nowotwory
 - choroby naczyń krwionośnych (choroba wieńcowa, choroby naczyń kończyn)
 - choroby neurodegeneracyjne (ALS, MS, ch. Alzheimer, ch. Parkinsona)
 - choroby reumatyczne
- Terapia chorób nabytych
 - urazy (złamania kości, leczenie ran)
 - choroby infekcyjne
- Znakowanie genami komórek



neuroblastoma
(SCID)

14.09. 1990r - Blaese RM, Anderson

at Institute of Health,
zy zastosowali terapię genową
owieka. 4 letniej pacjentce, Ashanti De
Silva , chorej na wrodzony, ciężki
odporności immunologicznej
powodowany brakiem aktywności
dezaminazy adenozyiny (ADA)

wprowadzono zmodyfikowane ex vivo autologiczne limfocyty T z
wprowadzonym prawidłowym genem ADA. Pacjentka żyje do dzisiaj,
wykazując 25% aktywność enzymu. 4 miesiące później taki sam
zabieg przeprowadzono u 9 - letniej dziewczynki **Cindy Cutshall**.



Jesse Gelsinger, 18 lat , pacjent
Institute for Human Gene
Therapy University of
Pensylwania zmarł 17 VII 1999r
z powodu powikłań po terapii
genowej przy użyciu
adenowirusa z genem OTC

Niedobór transkarbamyazy ornitynowej (OTC)
powoduje niezdolność do eliminacji z organizmu
amoniaku. J.G. cierpiał na łagodną postać choroby,
leczony na diecie bezbiałkowej miał w czasie choroby
trzy epizody śpiączki. Na drugi dzień po podaniu
adenowirusa z terapeutycznym genem zapadł w
śpiączkę i zmarł na 4 dzień z powodu obrzęku i
niewydolności płuc

Terapia genowa X-SCID.

Dr Marina Cavazzana-Calvo z Hopital Necker w Paryżu

Wprowadzono przy użycie retrowirusa genu kodującego łańcuch gamma receptorów interleukin IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 do komórek macierzystych szpiku CD34+ .

Po upływie 30-60 dni stwierdzono oznaczalne miana komórek NK i T.

Terapia genowa czerniaka złośliwego skóry

⌚ immunoterapia czynna (immunoterapia bierna - modyfikacja TIL (geny IL-2, $TNF\alpha$)

⌚ autoszczepionki) - modyfikacja genetyczna komórek nowotworowych

■ doguzowa iniekcja genów cytokin: IL-2, IL4, IL-7, IL-12, genu IFN gamma, GM-CSF, genu HLA-B7, E2F

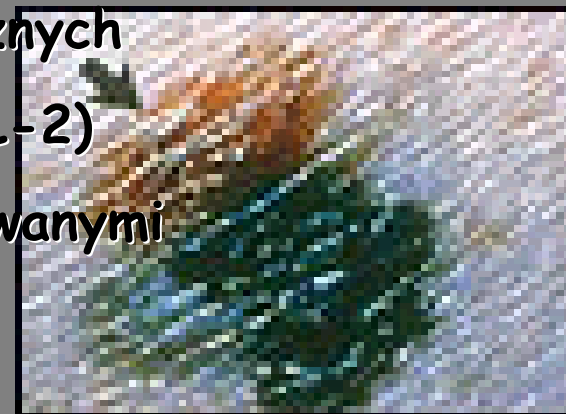
■ iniekcja zmodyfikowanych in vitro komórek:

- autologicznego guza (gen B7/ β -2 microglobulina, IL-4,, IL-6, IL-6R)

- allogenicznego guza

- zmodyfikowanych genetycznie ksenogenicznych komórek (komórki myszy z TK, Vero z IL-2)

■ iniekcja komórek guza łącznie ze zmodyfikowanymi genetycznie fibroblastami



Andrzej Mackiewicz. - Wielkopolskie Centrum Onkologii,
Poznań

Metoda transferu - retrowirus DCCMV

Metoda znakowania - B-galaktozydaza (Lac Z)

Stosowane geny: IL-6, IL-6R

Protokół terapii:

- wycięcie guza
- hodowla komórek guza
- transfekcja terapeutycznym genem
- naświetlenie komórek promieniami Roentgena
- domięśniowa iniekcja transgeniczných komórek

Wyniki:: Ok. 200 pacjentów z czerniakiem w III/IV stadium klinicznym. 0% reagowało na szczepionkę, z tego





