

Retroviry ve službách člověka

Filip Šenigl

Již v počátcích genového inženýrství se uvažovalo, zda by nebylo možné využít některých vlastností virů pro efektivní přenos genetické informace do buňky. Viry se jeví být přímo ideálními přenašeči — vektory — cizorodých genů. Jsou velmi dobře adaptovány pro přenos své genetické informace do buňky a zároveň jsou jednoduché a přístupné pro genové manipulace.

Zdaleka ne všechny viry jsou však vhodné k tomu, aby je genoví inženýři využili. Nutnou podmínkou je schopnost stabilně začlenit (integrovat) svou genetickou informaci do genomu hostitelské buňky a stát se jeho součástí. Tuto podmínku splňují především zástupci čeledí *Herpesviridae*, *Adenoviridae* a *Retroviridae*. Tyto tři čeledi se nejvíce používají pro přípravu virových vektorů určených pro přenos genů (genový transfer) a poslední dobou se stále častěji ocitají v rukou vědců zabývajících se genovou terapií. Snad největší zájem vzbudila poslední jmenovaná skupina — retroviry.

Od retroviru k retrovirovému vektoru

Retroviry jsou jednoduché RNA viry s genetickou informací uloženou na jedné molekule RNA o délce přibližně 10 kilobází (kb), která je v každé virové částici přítomna ve dvou kopiích (bližší také Živa 2000, 6: 245–248). Svou RNA jsou schopny přepsat do dvouřetězcové DNA a tu začlenit do genomu v jádře hostitelské buňky. Tato integrovaná forma retroviru se nazývá provirus. Expresi celého virového genomu řídí pouze jediný promotor (úsek na počátku genu, který určuje, kdy a v jakém množství bude vyráběna příslušná bílkovina), který může být rozmanitým způsobem modifikován.

Další významnou výhodou retrovirů je fakt, že celý mechanismus průniku viru do buňky, přepsání genomu do DNA, jeho začlenění do genomu hostitele i následná exprese nevyžadují přítomnost žádného virového genu v cílové buňce. Všechny potřebné proteiny si retroviry nesou s sebou přímo uvnitř virové částice (partikule). Díky tomu může být celý retrovirový genom, samozřejmě s výjimkou sekvencí řídících replikační cyklus retroviru, nahrazen genetickou informací, kterou chceme přenést. Takový upravený retrovirus již není schopen se dále replikovat a produkovat nové virové částice. To je však v genové terapii spíše výhodou než nevýhodou, jelikož se tím snižuje riziko mutací a selekce nebezpečných mutantů a to přispívá ke zvýšení bezpečnosti retrovirových vektorů.

Zkušenosti s léčbou pomocí retrovirových vektorů

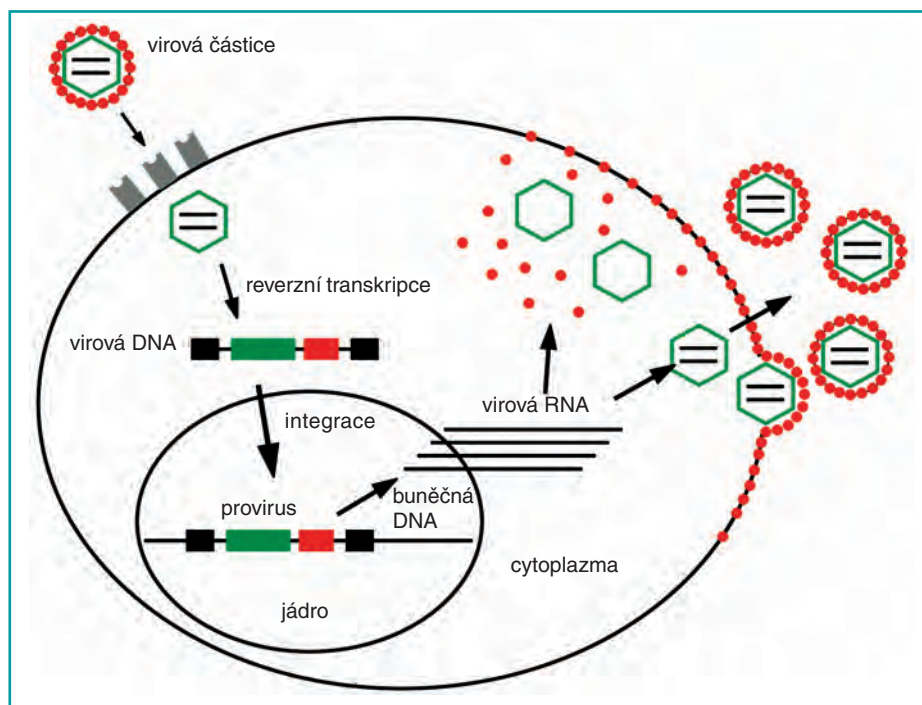
Rozsáhlé laboratorní pokusy poskytly slibné výsledky, a tak se modifikované retroviry začaly používat pro terapii některých vážných a jinými způsoby těžko léčitelných chorob. Asi nejznámějším případem je léčba syndromu SCID (Severe Combined Immunodeficiency Disease). Jde o velmi vážnou genetickou poruchu, která má za následek nefunkčnost lymfocytů nezbyt-

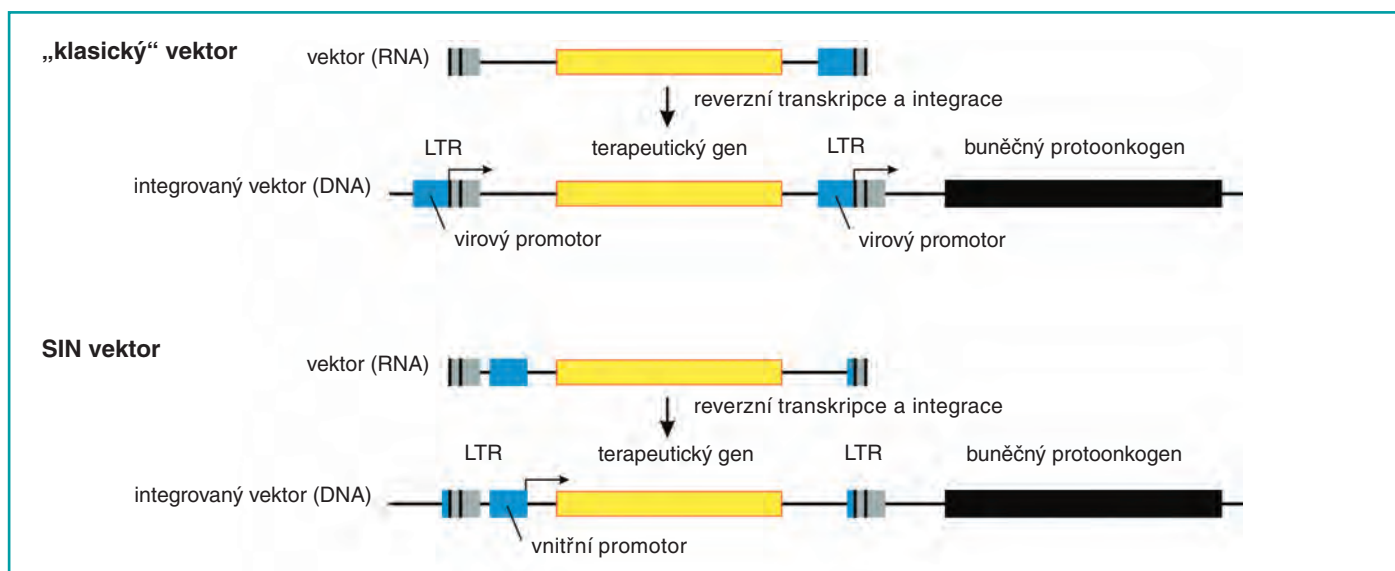
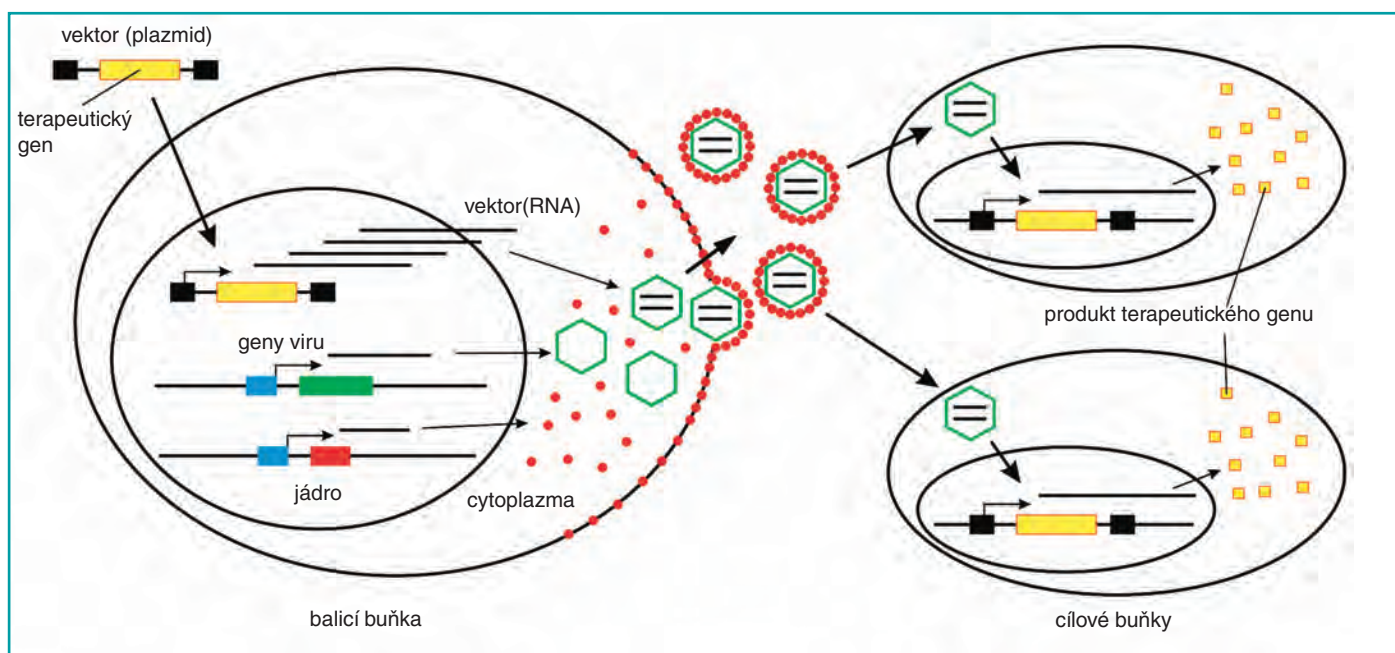
ných pro obranyschopnost organismu, v případě silného postižení nemocný obvykle umírá během prvních let života. Dříve byla pro nemocné jedinou nadějí transplantace kostní dřeně od zdravého dárce. Najít vhodného dárce je ovšem velmi obtížné a pokud se i najde, zůstává transplantace stále velmi riskantním zákrokem. Retrovirové vektory nabízejí možnost, jak se transplantaci vyhnout — jejich pomocí je možné poškozené lymfocyty opravit.

Choroba SCID může být způsobena mutací různých genů. Nejznámější jsou dva typy SCID. Prvním je SCID-X1 způsobený mutací tzv. běžného řetězce cytokinových receptorů γ (bílkoviny na povrchu buněk imunitního systému, které přijímají signály pro vývoj a funkci těchto buněk). Tato mutace způsobuje blok v diferenciaci (zrání) T lymfocytů a tzv. přirozených zabíječů (Natural Killers — NK buněk) a neschopnost B lymfocytů produkovat protilátky. Druhým typem je ADA-SCID způsobený mutací genu pro enzym adenosindeaminázu, což má mimo jiné za následek chyby ve vývoji a funkci všech lymfocytů. U obou variant SCID mají nemocní z větší části nefunkční imunitní systém. Vzhledem k tomu, že jde o chorobu způsobenou poruchou jediného genu, nabízí se léčba pomocí retrovirových vektorů. První pokusy s tímto způsobem léčby se uskutečnily už v r. 1990. Z krve nemocných s ADA-SCID byly izolovány T-lymfocyty a do nich byla pomocí retrovirového vektoru přenesena funkční kopie genu pro adenosindeaminázu. Takto geneticky modifikované T-lymfocyty byly pacientovi vráceny a výsledkem toho bylo výrazné zlepšení funkce imunitního systému. Tento postup je však velmi nevýhodný. Ani při vysoké koncentraci viru (vektoru) není možné infikovat všechny buňky, proto jsou opraveny pouze některé krevní buňky a navíc je nutné postup po čase opakovat, protože modifikované lymfocyty postupně mizí a jsou nahrazovány novými, které jsou opět nefunkční.

S nárůstem poznatků o kmenových buňkách a zejména s rozvojem metod jejich izolace a kultivace se objevila možnost opravit už kmenové buňky, které by pak dávaly vznik „zdravým“ buňkám imunitního systému. Jako první se takto léčila varianta poruchy SCID-X1. Byly izolovány kmenové buňky z kostní dřeně pacienta, v laboratorii infikovány retrovirovým vektorem nesoucím funkční gen pro řetězec cytokinových receptorů a takto opravené vráceny zpět nemocnému. Výsledky byly velmi povzbuzivé. U pacientů byly po 10 měsících nalezeny funkční T lymfocyty a NK buňky. Počet a funkčnost T a B lymfocytů a NK buněk

Replikační cyklus retrovirů. Virová částice pomocí receptorem zprostředkované endocytózy pronikne do cytoplazmy buňky, kde se virová RNA aktivitou enzymu reverzní transkriptázy přepíše do DNA. Tato DNA putuje spolu s dalším enzymem — integrázou do jádra a tam je integrována do DNA hostitelské buňky. Integrovaná forma retroviru se nazývá provirus. V hostitelské buňce jsou geny proviru přepsány do RNA. Část RNA je přeložena (translatována) a dává vznik virovému proteinům, část je do těchto proteinů zabalena. Komplex virové RNA a proteinů virové matrix vytvoří nukleokapsidu, která svůj obal získá pučením na cytoplazmatické membráně, do které se začlenily obalové proteiny viru, a opouští buňku za vzniku nových virových částic





byla srovnatelná s úrovní běžnou u zdravých jedinců.

Nadšení z výtečných výsledků bohužel netrvalo dlouho. V jednom klinickém testu se postupem času u tří z 11 pacientů vyvinula T buněčná leukémie (zhoubné přemnožení T lymfocytů). Tyto problémy vedly na určitou dobu k zastavení klinických zkoušek a k intenzivnímu pátrání po příčině vzniku leukémie u takto léčených lidí. Pro genovou terapii byly v tomto případě použity vektory na bázi viru myší leukémie. Tento virus byl objektem intenzivního výzkumu a retroviróvé vektory z něj pocházející byly považovány za relativně bezpečné. Vždyť byly odstraněny všechny virové geny. Ukázalo se však, že vznik T buněčné leukémie nijak nesouvisel s geny viru. Retroviry před integrací svého genomu do DNA hostitelské buňky zdvojují svůj promotor. První z nich řídí virové geny (v případě retroviróvého vektoru terapeutický gen), zatímco druhý (umístěný na konci virového genomu) je tam jakoby navíc a může aktivovat gen nebo geny, které se nacházejí za místem, kam se retrovirus integroval. A to byl právě případ tří pacientů, kterým se retroviróvý vektor u několika málo buněk (nebo možná jen u jediné) začlenil před buněčný protoonkogen, který aktivoval a způsobil tak nekontro-

Nahoře: Příprava retroviróvého vektoru a infekce cílových buněk. Do buněk, které v sobě mají stabilně integrované geny viru, z něhož je odvozen vektor — tzv. balící buňky (z angl. packaging cells) — je vnesena DNA obsahující kompletní sekvenci vektoru. Tato DNA je v buňkách přepsána (transkribována) a velká část vznikající RNA je zabalena do proteinů kódovaných virovými geny. Komplex těchto proteinů s RNA vytvoří virové částice, které se z buňky uvolňují. Vzniklé viriony slouží k infekci cílových buněk a tedy pro přenos terapeutického genu. Po infekci cílových buněk je RNA vektoru přepsána do DNA a ta je integrována do DNA buňky. K tomu potřebné enzymy, reverzní transkriptázu a integrázu, si virová částice nese s sebou z balících buněk. Terapeutický gen je v cílových buňkách přepsán a dává vznik příslušnému proteinu

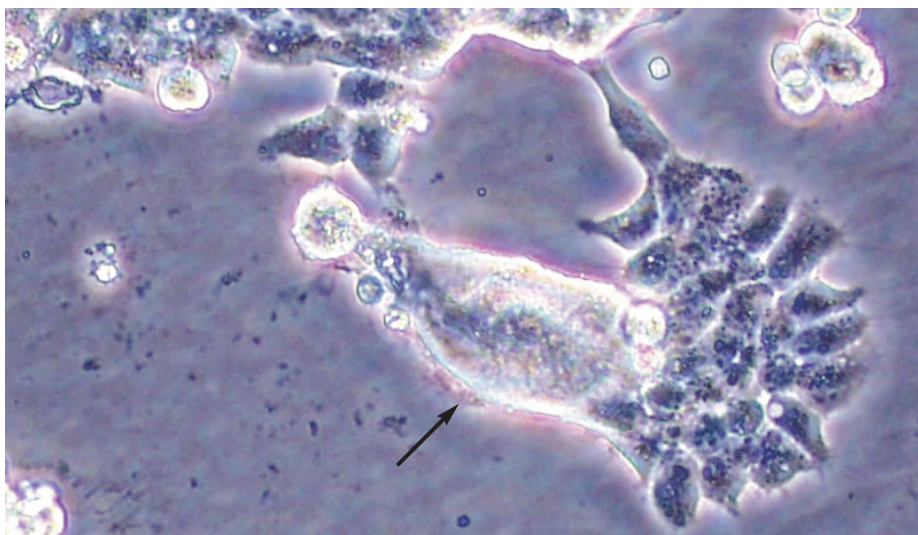
lované množení takové buňky a následný vznik leukémie.

Vědci zabývající se retroviróvími vektory si už dříve byli rizika vzniku zhoubného bujení (malignity) vědomi, neboť virus myší leukémie, z něhož výše zmíněný vektor pochází, je chronicky transformující (tzn., že nepřenáší svůj vlastní onkogen, ale může vyvolat zhoubné bujení ovlivněním buněčného protoonkogenu). Avšak pravděpodobnost takové události byla u replikačně defekt-

Dole: Ovlivnění buněčných protoonkogenů retroviróvími vektory. Klasické vektory mají plně funkční LTR sekvenci (virový promotor). Pokud se vektor začlení do buněčné DNA před protoonkogen, může svým pravým LTR ovlivnit jeho expresi. To může následně vést k nekontrolovanému dělení buňky. SIN (self-inactivating) vektory nemají virový promotor funkční (promotor je v LTR odstraněn deletí) a expresi terapeutického genu řídí vnitřní promotor. Proto nehrozí nebezpečí, že by mohly převzít kontrolu nad buněčným protoonkogenem a řídit jeho expresi ze svého promotoru

ních vektorů považována za velmi malou. Výpočty vycházející z náhodné integrace neukazovaly na velké nebezpečí. Jak se později ukázalo, problém byl v tom, že se virus myší leukémie neintegruje do genomu náhodně, ale přednostně na začátek genů a tím se výrazně zvyšuje riziko, že se aktivuje buněčný protoonkogen a způsobí zhoubné bujení. Dříve velmi oblíbený virus myší leukémie se tak ukázal jako velmi nevhodný. Začalo proto velké pátrání po vhodnějších vektorech a po způsobech, jak zvýšit bezpečnost retroviróvích vektorů.

Jako nejvhodnější se v současné době ukazují být lentiviry, podskupina retrovirů, kam patří např. dobře známý virus HIV-1



Buňky produkující virové částice vektoru. Do buněk GP293 byla vnesena plazmidová DNA obsahující kompletní sekvenci vektoru a zároveň plazmid, který zajišťuje produkci obalového proteinu viru vesikulární stomatitidy (VSV-G, blíže v textu). Tyto buňky následně uvolňují do média virové částice obsahující genom vektoru ve formě RNA a mající obal tvořený proteinem VSV-G. Produkce proteinu VSV-G a jeho integrace do plazmatické membrány těchto buněk způsobuje splývání membrán sousedících buněk a charakterickou tvorbu syncytií (soubuní, viz šipka). Foto a orig. F. Šenigla

(viz Živa 2003, 3: 98). Ty se sice také integrují do genů, ale přednostně do kódující sekvence než na začátek genu. Tím mohou příslušný gen poškodit, ale díky tomu, že máme od většiny genů dvě funkční kopie, není riziko vyrazení systému kontrolujícího buněčné dělení příliš velké. Vznik zhoubného bujení je tak méně pravděpodobný. Kromě menší rizikovitosti mají lentiviry oproti viru myši leukémie další výhodu. Spočívá v jejich schopnosti účinně začlenit svou genetickou informaci do nedělicích se buněk. Virus myši leukémie vyžaduje pro přenos genetické informace dělicí se buňky.

Retrovirové vektory na cestě k dokonalosti

Výběrem vhodnějšího retroviru zvyšování bezpečnosti virových vektorů zdaleka nekončí. Mnoho práce bylo uděláno také na modifikacích vektorů, které dále snižují jejich rizikovitost. V současné době jsou asi nejpoužívanější tzv. self-inactivating (SIN) vektory, které se samy inaktivují ztrátou virového promotoru (viz obr.). Tyto vektory mají odstraněný virový promotor a terapeutický gen je řízen tzv. vnitřním promotorem. Proto při procesu, který předchází začlenění do buněčného genomu, nemůže dojít ke zdvojení promotoru a integrovaný retrovirus nemá na svém konci promotor, který by mohl aktivovat přilehlé geny. Riziko vzniku zhoubného bujení po terapii SIN lentivirovými vektory je tak sníženo na minimum.

Použití vnitřního promotoru pro řízení terapeutického genu má ještě další výhodu. Vzhledem k tomu, že tento promotor může být téměř libovolný, lze k přípravě vektoru pro příslušnou terapii použít tkáňově specifický promotor, který zajistí, že terapeutický gen bude funkční pouze v té tkáni, ve které je funkce žádoucí. Virové promotory jsou obvykle aktivní ve všech tkáních, což v některých případech může vést ke zdravotním komplikacím.

Modifikované SIN lentivirové vektory slouží jako účinná a relativně bezpečná přenašeči genů. Kromě modifikace genomu vektoru, zajišťující bezpečnost a případně také tkáňovou specifitu, je však nutné ještě pozměnit obálku (kapsidu) virové částice, která tento genom přenáší. U dříve používaných vektorů odvozených z viru myši leukémie bylo často možné využít obalový protein původního viru. Tento obal byl obvykle schopen zajistit infekci širokého spektra

různých buněk. Avšak lentiviry mívají velmi specifický obal a v mnoha případech jsou schopné přenést genetickou informaci pouze do určitých buněk. Např. obalový protein viru HIV-1 dokáže zajistit (s výjimkou vzácnějších mutantů) infekci pouze jedné podskupiny T lymfocytů. Tento problém je naštěstí snadno řešitelný. Při výrobě virových partikul obsahujících genom vektoru v tzv. balících buňkách (tyto buňky mají v sobě stabilně začleněny geny viru, ze kterého je vektor odvozen) lze nahradit obalový protein původního viru proteinem pocházejícím z jiného, často příbuzensky velmi vzdáleného viru. V tomto směru je asi nejznámější a nejpoužívanější G protein virového zánětu ústní dutiny (vesikulární stomatitidy, VSV-G). Virové partikule, které nesou na svém povrchu VSV-G, jsou schopné infikovat nejen buňky lidské, ale dokonce i buňky ptáků nebo hmyzu.

Dalším virovým proteinem, o kterém se uvažuje jako o náhradní obálce pro retrovirové vektory, je obalový glykoprotein zairského kmene viru Ebola (EboZ). Ten se ukázal být velmi účinný při přenosu vektorů do buněk plicního epitelu. Je zde výrazně účinnější než výše zmiňovaný VSV-G. EboZ obal by našel využití zejména v případě genové terapie cystické fibrózy. Cystická fibróza je vážná choroba způsobená mutací v genu kódujícím chloridový kanál v plicním epitelu (Živa 2000, 5: 199–200). Účinný přenos funkčního genu do těchto buněk by znamenal buď úplné vyléčení, nebo výrazné zlepšení zdravotního stavu nemocného.

Lentivirové vektory obalené proteinem VSV-G nebo EboZ platí již za účinné a relativně bezpečné přenašeče genů. To ale zdaleka neznamená, že už není co zlepšovat. V současné době se vyvíjí značné úsilí na zvýšení účinnosti přenosu genetické informace do kmenových buněk a její následné funkce. Moderní vektory dokáží s velkou efektivitou proniknout do kmenových buněk a integrovat genetickou informaci do jejich genomu. To ale ještě nemusí znamenat úspěch. V kmenových buňkách dochází totiž s velmi vysokou frekvencí k umlčování cizorodých genů. Přenášený terapeutický gen se tak sice stane součástí genetické informace cílových buněk, ale pomocí epigenetických mechanismů, jako je metylace DNA a modifikace chromatinu, je umlčen a jeho přítomnost se neprojeví. K umlčování naštěstí nedochází se stoprocentní účinností. Genová terapie kmenových buněk musí ale zatím spoléhat na to,

že malá populace buněk, ve kterých vektor unikne umlčení, bude dostatečná pro úspěch léčby. I v této oblasti byly učiněny významné pokroky. Dnes je již možné do vektoru umístit elementy, které ho do značné míry ochrání před umlčením. Příkladem je tzv. chromatinový izolátor (CHS4) pocházející z kuřecího genu pro β -globin. Umístění tohoto elementu na oba konce vektoru významně zvyšuje pravděpodobnost, že tento vektor nebude umlčen. Tím se stává přenos genu daleko efektivnějším.

Po všech výše zmíněných modifikacích máme k dispozici účinný a relativně bezpečný retrovirový vektor schopný „opravovat“ i kmenové buňky. Předchozí špatné zkušenosti z terapie SCID vedou k otázce, zda by nebylo možné vybavit vektor něčím, co by umožnilo účinný zásah proti infikovaným buňkám v případě, že by u pacientů došlo k nežádoucímu efektu vyvolanému terapií. Touto „pojistkou“ by mohl být jakýsi sebevražedný gen, který by bylo v případě potřeby možné aktivovat a zajistit tak zničení vektorem pozměněných buněk. Jedním z kandidátů pro tento sebevražedný gen by mohl být pro podobné účely využívaný gen pro enzym thymidinkinázu viru *Herpes Simplex*. Gen pro thymidinkinázu by se umístil do vektoru za konstitutivní promotor (který je trvale aktivní ve všech buňkách a orgánech) společně s terapeutickým genem. Pokud by po terapii došlo např. k rozvoji leukémie, stačilo by podat nemocnému preparát gancyklovir a leukemické buňky by zahynuly. Thymidinkináza, která by byla v těchto buňkách přítomna, by zajistila přeměnu gancykloviru na toxický produkt likvidující zejména rychle se množící buňky.

Z předchozího textu vyplývá, že retrovirové vektory prodělaly dlouhý vývoj. Dnešní generace vektorů nemá s těmi prvními už mnoho společného. Díky možnosti použít pro obal vektoru obalové proteiny jiných virů bylo významně rozšířeno spektrum buněk, které lze geneticky modifikovat. Největší pokrok byl však učiněn ve zvyšování bezpečnosti vektorů. Dnes používané SIN lentivirové vektory neznamenají pro pacienta velké riziko a neoplazie způsobené terapií se už nevyskytují. Nicméně stále je co zdokonalovat. Zejména v účinnosti genového přenosu jsou velké rezervy. Výše zmíněný chromatinový izolátor CHS4 má omezenou účinnost, a tak se pátrá po efektivnějších způsobu, jak ochránit vektor před umlčením. Stejně tak je zapotřebí zvýšit účinnost vlastní infekce *in vivo*. Možným řešením je kombinace retrovirových vektorů s adenovirovými, které by v místě aplikace zajistily produkci vektoru a zvýšily tak lokálně koncentraci viru. Retrovirové vektory v sobě skrývají velký terapeutický potenciál a budoucnost ukáže, nakolik ho budeme schopni využít.