مروری بر ژن درمانی

دکتر رضا فروغ(۱)

دکتر کوروس معتمد(۲)

خلاصه:

پیشرفتهای چشمگیری که در بیولوژی ملکولی حاصل شده و با دسترسی به امکاناتی که دستکاری و یجائی ژرف را تسهیل کرده است (مثل کشف restriction enzymes، روشهای cloning) بتدریج کان مداوای بیماریهای مختلفی که از نقص غیر قابل برگشت در ساختار ژنتیکی سلولها سرچشمه می‌گیرند راهم می‌شود . بطور خلاصه در این روش با شناسائی ژن معیوب و همچنین وضعیت طبیعی آن ژن ، پس از سازی ژن سالم لابلای محتوای ژنتیکی سلولهای بدن و وارد کردن آن سلولها به بدن ، تولید محصول یعی آن ژن مجددابرقرار می‌شود . در حال حاضر برای جاسازی ژن در سلولها از رترو ویروسها استفاده شود و لنفوسیتها، سلولهای کبدی ، فیبروبلاستهاو میوبلاستها بیشتر از سایر سلولهای بدن مورد هدف سازی ژن مهندسی شده قرار می‌گیرند. در این مقاله با مروری بر اصول ژن درمانی به موفقیتهای دوارکننده در زمینه ژن درمانی حاصل شده نیز اشاره می‌شود.

ژن درمانی

، به معنی مداوای بیماریهای موجودات زنده از طریق گنجاندن یک ژن سالم در درون ساختار ژنتیکی شد که در چند سال اخیر بشدت مورد توجه محققین قرار گرفته است . ۱و۲ بیولوژی ملکولی زیربنای ، را تشکیل می‌دهد .

صه کشف restriction enzymes ۳ (که DNA را در نقاط مشخصی قطع می‌کند) و توسعه تکنیک ۴ از جنبه های مهم بیولوژی مولکولی بوده که مستقیماًدر پیشرفت ژن درمانی نقش مهم و اساسی ایفا راکه ژن مورد نظر پس از قطع و جداسازی توسط restriction enzymes از طریق cloning در داخل ناسب قرار داده می‌شود و بدین ترتیب می‌توان ژن موردنظر را به به شکل یک بسته بندی قابل تکثیر

گاه واشنگتن) عضو هیئت تحریریه افتخاری مجله دانشگاه علوم پزشکی زنجان

د واشنگتن

در موجود زنده آماده بهره برداری نمود . عوامل موفقیت این بسته بندی که در نهایت ضامن موفقیت ژن درمانی هستند عبارتنداز :

الف - promotor ۷،۶،۵ : که امروزه معمولاً از رترو ویروسها انتخاب می‌شوند .

ب - poly A taie ۸ :که زنجیری از باز آدنسین بوده و به انتهای ژن افزوده می‌شود .

پ - enhancer ۹ : مقدار سنتز ژن مورد نظر را چندین برابر افزایش می‌دهد . عنصرمهمی ندارد ولی در رابطه با مکانیسم فعالیت ژنها از دیدگاه علوم پایه قابل توجه است .

محققین این عناصر کلیدی را با استفاده از restriction enzymes از محیط طبیعی خود یعنی نوکلئیک اسیدهای انسانی یا ویروسهای حیوانی جدا نموده و سپس به کمک گروه دیگری از آنزیمهابه نام ligase آنها را به پلاسمیدها اتصال می‌دهند ۱۱،۴ چنین پلاسمید تغییر شکل یافته‌ای که اصطلاحاً expression vector نامیده می‌شود قابلیت حمل یک ژن وتولید پروتئین مربوطه در داخل بافتهای زنده را دارا می‌باشد.

روشهای انتقال ژن مهندسی شده به درون سلول حیوانی:

اگر چه اولین روش موفق انتقال ژنها calcum phosphate transfection ۱۲ بوده ولی در این روش معمولاً از بین یک هزار و گاهی یک میلیون سلول حیوانی تنها یک سلول و آنهم در ظروف کشت آزمایشگاهی ژن مورد نظر را پذیرا می‌شوند. در سالهای اخیر استفاده از رترو ویروسها بعنوان " عامل انتقال " رایج گشته است . ۱۳ این روش یعنی انتقال ویروسی ژنها بدلیل بازدهی بیشتر و قابلیت معرفی ژن درمانی کسب کرده است . در دو سال اخیر متخصصین ژن درمانی توجه خود را به ویروس دیگری به نام آدنوویروس ۱۲ بعنوان عامل انتقال ژن معطوف کرده‌اند.

رترووویروسها

در مورد بیولوژی و ساختمان مولکولی رترووویروسهامقالات فراوانی به چاپ رسیده است ۱۵ از نظر ساختمان این گروه از ویروسها دارای ۳ ژن ضروری به اسامی gag ، dol و enr هستند که بین دو LTR (long terminal repeat) ویروس قرار دارند .عنصر کلیدی promotor در LTR ویروس قرار دارد . محققین ژن درمانی این سه ژن را به کمک restriction enzymes از ویروس جدا نموده و ژن مورد نظر خود را جایگزین می‌کنند.۱۴،۱۳ در همین رابطه محققین سلولهای فیبروبلاستی موش (NIH 3T3) را به گونه‌ای مهندسی نموده اند که می‌تواند سایر پروتئینهای لازم برای بسته بندی و تشکیل ویروس کامل (مثلاً پروتئین env.) را تولید می‌کند. این سلولها را اصطلاحاً سلولهای بسته‌بندی کننده (packaging cell line) می‌نامند زیرا پس از دریافت ژنی که در رترووویروس متمرکز شده است ، یک ویروس نو ترکیب شده ایجاد کرده و آنرا به خارج از سلول در داخل ظرف کشت آزمایشگاه ترشح می‌نمایند .۱۷ برای انتقال این ویروسها می‌توان از سلولهای مختلف بدن مثلاً لنفوسیتها ۱۸و۱۹، هپاتوسیتها ۲۰ یا فیبروبلاستهای پوست ۲۱ استفاده نمود. تیتر ۵×۱۰ تا ۱×۱۰ ویروس در میلی‌لیتر معمولاً کافی است .

باید به این نکته مهم توجه داشت که مراحل ذکر شده فعلاً در خارج از بدن انسان و در ظروف آزمایشگاهی انجام می‌گیرد و اخیراً دانشمندان در جستجوی شیوه‌های جدید انتقال ویروس نو ترکیب شده به داخل سلولهای موجود زنده هستند.۲۲

ژن درمانی در انسان

در ابتدای مطرح شدن ژن درمانی در جانداران محققین و پزشکان دو دیدگاه را همواره مورد بحث قرار می‌دادند:

الف - معالجه چه امراضی‌ازطریق ژن درمانی موفقیت‌آمیزتر است ؟

ب - در معالجه کدام سلولهای بدن را باید هدف قرار داد؟

در پاسخ به سئوال اول باید بیماریهائی انتخاب شوندکه نه تنها علت آنها کاملاً شناخته شده باشد بلکه رابطه علت و معلولی بین آنها به اثبات رسیده باشد . به این ترتیب که اگر بیماری X بدلیل عدم تولید یا تولید ناکافی آنزیم Y دردر بدن فرد ایجاد می‌شود با معرفی ژن تولید کننده آنزیم Y از راه ژن درمانی بتوان بهبودی بیماری x را مشاهده نمود. بر

چنین استدلالی در سال ۱۹۹۰ اولین عمل
انی بر روی بیماری که کمبود آنزیم آدسنین
س (ADA)داشت انجام شد .
: آنزیم ADA ، بدلیل تجمع ماده‌ای به نام
2:deoxyader که برای لنفوسیتهای
ندداشت،بیماری "نقص ایمنی توام" (Combined)
(Immunodefic حاصل می‌شود که می‌توان
از پا در بیاورد. ۲۶ راههای کلاسیک مداوای
اری پیوند مغزاستخوان‌ازسوی یک "دهنده
"که به دشواری یافت می‌شود و یا تزریق
ADA تصفیه شده از گاو هستند.
عمل آزمایشی بر روی انسان ابتدا ژن ADA
، رتروویروسها در داخل لنفوسیتهای Tبیمار
، شد و این سلولهای مهندسی شده در طول
۸ بار به بیمار تزریق گردید که نتایج بسیار
کننده‌ای به دنبال داشت . مقدار ADA این
زیر ۲٪ مقدار طبیعی افزایش یافت . جالب
عدادی از لنفوسیتهای T تزریق شده ، حتی تا
س از توقف تزریق نیز در بدن بیمار زنده و
ده اند .

ج به سئوال دوم در ابتدا محققان و پزشکان
ن رده خونساز ۲۷ را بعنوان هدف مطلوب
، درمانی انتخاب کردند . زیرا این سلولها
پذیری بالا داشته و قابلیت تکامل دارند و
ن پیوند مغز استخوان به راحتی در دسترس
ست . اما چندی بعد سلولهای دیگری مثل
ستها ۲۸ ،۲۹ و هپاتوسیتها و فیبروبلاستهای
، نیز بکار گرفته شدند . علت انتخاب
ستها این بود که این سلولها بر اساس برنامه
نتیکی خود اتصالاتی را با سلولهای مجاور
ل داده و میتوتیوپ را ایجاد می‌کنند.اگر
ستی از نظر مهندسی ژنتیک دستخوش
گردد ، ژن مورد نظر را به سلولهای مجاور
ل می‌دهد.

خاب لنفوسیتها برای توضیح در مقاله ، این
تاریخ ژن درمانی با هدف قراردادن این نوع
آغاز گردید. قبل از تولد ژن درمانی محققین
، شناسائی یک گروه خاص از لنفوسیتها در
پوستی ملانوما شدند که آنها را لنفوسیتهای
سر به درون تومور (tumor Infiltrating lymphocytes) یا TIL نامیدند. این نوع لنفوسیتهای TIL از خود غده سرطانی متشابه می‌گیرند و دارای درصد قابل توجهی از سلولهای مصونیتی یعنی T-cytolytic,T-helper هستند. فرضیه محققین در ابتدا چنین بود که پدیدآمدن لنفوسیتهای TIL در حقیقت تشکیل یک نوع سیستم دفاعی بر علیه غده سرطانی است ولی بدلیل اینکه رشد غده سرطانی چندین برابر سریعتر از تکثیر TIL می‌باشد این سیستم دفاعی در دراز مدت مؤثر نیست . از آنجائیکه لنفوسیتهای TIL نیز مانند سایر لنفوسیتها با حضور اینترلوکین - ۲ تقسیم و تکثیر می‌یابند، محققین از این خاصیت برای تقویت سیستم دفاعی بر علیه ملانوما استفاده کردند که خود رشته به نام ایمنی درمانی را بوجود می‌آورد.۳۳باتولد ژن درمانی روزنبرگ (Rosenberg) و همکارانش پس از استخراج TIL از بدن بیمار ملانوماتو و کشت آن در آزمایشگاه ژنهای مختلفی را از طریق ویروسهای نو ترکیبی به این سلولها وارد کردند و این لنفوستهای مهندسی شده را مجدداً به بدن بیمار تزریق کردند.۳۴ در این مهندسی ژنتیکی ، روزنبرگ و همکارانش بر اساس یک حدس علمی ژن تولیدکننده IL-2 را در درون TIL ها جاسازی کردند . فرضیه او براساس شواهد زیر طراحی شده بود :

الف - لنفوسیتهای TIL که با In ۱۱۱ نشاندار شده بودند چندروز پس از تزریق بطور محسوسی در محل تومور تجمع پیدا می‌کردند.۳۵

ب - ۹ بیمار از ۱۵ بیمار مبتلا به ملانمای متاستاتیک با دریافت ترکیبی از TIL و IL-2علائم پس رفت تومور را نشان داده بودند.۳۱

بدلیل عوارض جانبی تزریق مستقیم IL-2 به خون معرفی TIL مهندسی شده یعنی لنفوسیت قادر به تولید IL-2 در حقیقت تلاش برای ایجاد یک روش درمانی جدید است که بازدهی TIL در فعالیت ضد تومورال خود را افزایش می‌دهد. فهرست ژنهائی که محققین در داخل TIL ها جا سازی می‌کنند، روزبه روز افزایش می‌یابد.

Tumor necrosis factor(TNF) یاعامل‌نکروزتومور پروتئنی با خاصیت آنتی تومورال است که تزریق آن در رگهای موشهای

آزمایشگاهی مبتلا به تومور نتایج امیدوار کننده ای مثل کوچک شدن حجم تومور وجود داشته‌است. TNF ۳۷،۳۶ یکی از پروتئینهایی است که ژن آن از طریق رتروویروسها در درون TIL جاسازی شده و به بدن بیماران ملانومایی تزریق گردیده است. نتایج حاصله از درمان بوسیله TNF هنوز یکجا منتشر نشده است. اما بطور اجمالی می‌توان که عوارض جانبی مورد انتظار بدنبال افزایش تولید TNF در بدن بیمار هیچگاه نمایان نگردیده است در حالیکه در مطالعات دیگر نشان داده شده که تزریق TNF به میزان ۸ میکروگرم به ازرش هر کیلوگرم وزن بدن عوارض جانبی ناخوشایندی را در زنان بوجود آورد. و این یافته امیدوار کننده ای است. یافته امیدوار کننده دیگر، بدست آمدن ژن TNF در خون بیمار ۶ ماه پس ازتزریق سلولهای مهندسی شده TIL است.

بنابراین می‌توان امیدوار بود که تلفیق سه روش جدید مهندسی ژنتیک ،ایمنی درمان و ژن درمانی در آینده امکان ترشح یک ماده آنتی تومورال مثل TNF در بدن بیمار را بگونه ای فراهم کند که کشنده و مرگ آور نبوده و علاوه بر آن ماده آنتی تومورال را به یک هدف مشخص بایستی کانون تومور هدایت کند. در حال حاضر یکی از اساسی ترین مشکلات متخصصان ژن درمانی هدف گیری اختصاصی سلولهای موردنظر هستند.

دیدگاه کلی

شواهد حاصل از تحقیق در زمینه ژن درمانی در دو دهه اخیر نشان می‌دهد که تا شروع قرن بیست و یکم و مکان ترمیم و بازسازی ژنهای معیوب از طریق معرفی انواع طبیعی آنها به درون ساختمان ژنتیکی بیمار عملی خواهد بود. اگرچه در باره فطرت تکنیکی و پزشکی ژن درمانی مقالات فراوانی به چاپ رسیده است و حتی ژن درمانی‌ازدیدگاه فلاسفه موردانتقاد قرارگرفته‌است.۲۴،۲۳ به علاوه محققین هنوز با دشواریهای تکنیکی مختلفی روبرو هستند از جمله:

الف - انتخاب حامل مناسب برای تحویل دادن محموله ژنتیکی به هدف مورد نظر.

ب - انتخاب نوع و بافت و عضو مناسب به عنوان هدف ژن درمانی.

ج - راههای کاهش خطرات - بخصوص بدلیل شناخت دیرینه خاصیت سرطانزائی رتروویروسها استفاده از این ویروسها برای مداوای بالینی بیماران از طریق ژن درمانی، هنوز از سوی بسیاری از محققین و پزشکان مورد سئوال قرار دارد.

علیرغم این دشواریها بی تردید ژن درمانی در آینده معالجات پزشکی نقش عظیمی را ایفا خواهد نمود.امروزه پیشرفتهای علمی مخصوصاً در زمینه بیولوژی ملکولی که یکی از اصول ضروری ژن درمانی است، اطلاعات وسیعی در باره نقصهای ژنتیکی در بیماریهائی مثل آلزهایمر، کمبود ADA، بتاتالاسمی فراهم کرده است.

در ادامه این مسیر ترقی هم، ژن درمانی شاخه جدیدی را در معالجه بیماریها بنیان خواهد نهاد.

REFRENCES :

1.Anderson,W.Prospects for human gene therapy. Science 226:401-409(1984).

2.Hammer,R.,Palmiter,R.,Brinster,R.Partial correction of murine hereditary m hereditary growth disorder by germ-line incorportion of a new gene.Nature.311:65-67(1984).

3.Roberts,R.Restriction and modification enzymes and their recognition sequences.Nucleic Acid Res. 11:r135-r167 (1983).

4.Watson,j.,tooze,j.,Kurtz,D.Recombinant DNA:a short course.San Francisco:Freeman 1983.

5.McClure,W.Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. Ann.Rev.Biochem.54:171-204(1985)

6.Youderian,P.,Bouvier,S.,Susskind,M.Sequence determinants of promoter activity.Cell.30:843-853(1982) activity.Cell.30:843-853(1982).

7.Shenk,T.Transcriptional control regions:nucleotide sequirements for initiation by RNA

polymerase II and III Current topics in Microbiology and Immunology.93:25-46
8.Mclaughlin,C.,Warner,j.,Edmonds,M.,Nakazato,H.,Vaughn,M.polyadenylic acidsequences in yeast messenger ribonucleic acid.j.Biol.Chem.248:1466-147
9.Khoury,G.,Gruss,P.Enhancer elements.Cell.33:313-314(1983).
10.Leiden,J.Transcriptional regulation of cell receptor genes.Annu.REv.Immunc 11:539-570(1993).
11.Stelow,J.,Hollaender,A.Genetic engineering-Principles and Methods Vol.4 N\
12.Graham,F.,Van der Eb,A.A new technique for the assay of infectivity c adenovirus 5 DNA.Virology.52:456-467(1973).
13.Gilboa,E.,Eglitis,M.,Kantoff,P.,Anderson,W.Transfer and expression of clone using retroviral Vectors.Bio techniques. 4:504-512(1986).
14.Cristiano,R.,smith,L.,Woo,S.Hepatic gene therapy:adenovirus enhance receptor mediated gene delivery and expression in hepatocytes.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2122-2126(1993).
15.Weiss,R.,teich,N.,Varmus,H.,Coffon,J.RNA tumor viruses.NY:Cold Spring Laboratory.(1982).
16.Miller,A.,Rosman,G.improved retroviral Vectors for gene transfer and expre technology.7:980-990(1990).
17.Miller,A.,Buttimore,C.Redesign of retrovirus packaging cell lines t recombination leading to helper virus production.Mol.Cell.Biol.6:2895-2902(19
18.Kasid,A.,Morecki,S.,Aebersold,P.,Cornetta,K.
,Culver,K.,Freeman,S.,Director,E.,Iotze,M.,Blaese,M.Anderson ,W.,Rosenberg, gene transfer:characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes as vei retroviral-mediated gene transfer in man.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:473-477(1
19.Miller,A.,Stotzko,M.,Rhoades,K.,Belldegrun ,A.,Tso,C.,Kaboo,R.,Mcbride,\
,E.,Kohn,D.,Moen,R.,Economou,J.Simultaneous use of two retroviral vectors i gene marking trials: feasibility and protential applications. Hum.Ge 3:619-624(1992).
20.Chowdhury,J.,Grissman,M.,Gupta,S., chowdhury, N.,Baker,J.,Wilson,J.L improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR rabbits. Science. 254:1802-1805.(1991).
21.palmer.T.,Rosman,G.,Osborne,W.,Miller,A.Genetically modified skin fibroblas long after transplantation but gradually introduced genes. proc.natl. Acad. Sci. 1330-1334 (1991).
22.Nabel, E., Yang,Z.,plautz,G.,Forough,R.,Zhan,X.,Haudenschild, C.,Maciag,T. Recombinant fibroblast growth factor-1 gene expression in porcine arteries intimal hyperplasia and angiogenesis in vivo nature.362:844-846(1993).
23.Fletcher,J. Ethical issues in and beyond prospective clinical trials of hun therapy.J.Med. philos. 10:293-309(1985).
24.Anderson, W. Human gene therapy. Science. 256:808-813(1992).

25.Blaese,R. Development of gene therapy for immunodeficiencv : adenosine deaminase deficiency. pediatr.Res. 33:S49-53(1993).

26.Hirschhorn,R. Overview of biochemical abnormalities and molecular genetics of adenosine deaminase deaminase deficiency. Pediatr. Res. 33:S35-41 (1993).

27.Schuening,F., Kawahara,K.,Miller A.,To,R.,Goehle,S., Stewart,D.,Mullally,K.,Fisher,L..,Graham,T.,Appelbaum ,F.,Hackman,R.,Osborne,W.,Storb,R. Retrovirus-mediated gene transduction into long-term repopulating marrow cells of dogs. Blood. 78:2568-2576(1991).

28.Barr,E.,leiden,J.Systemic delivery of recombinant proteins by genetically modified myoblasts. Science. 254:1507-1509(1991).

29.Dhawan,J.,Pan,L.,Pavlath,G., Travis,M.,Lanctot,A.,Blau,H. Systemic delivery of human growth hormone by injection of genetically engineered myoblasts. Science. 254:1509-1512(1991).

30.Miller,D.,Adam,M.,Miller,A.Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. Mol.Call.Biol. 10:4239-4242(1990).

31.Rosenberg S.,packard,B.,Aebersold.,Topalian,S.,Toy,S. ,Simon,S.,lotze,M.,Yang,j.,Seippe,C.,Simpson,C.,Carter, C.,Bock,S.,Schwartzentruber,D.,Wei,J.,White. D. Use of tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma.N.Engl. J. Med. 319:1676-1680(1988).

32.todalian.S.,Solomon,,D.,Rosenberg,S. Tumor-specific cvtolvsis by lymphocytes infiltrating human melanomas. J. immunol.142:3714-3725(1989).

33.Rosenberg,S. The development of new immunotherapies for the treatment of cancer using interleukin-2 :a review. Ann. Surg. 208:121-135(1988).

Rosenberg,S.,Aebersold,P.,Cornetta,K.,Kasid,A.,Morgan. R.,Moen,R.,Karson,E.,Lotze,M,Yang,J.,Topalian,S.,Merino, M.,Culver,K.,Miller, A., Blaese,M., Anderson,W. Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltration lymphocytes modified by retroviral gene transduction. N. Engl. J. Med. 323:570-578(1990).

35. Fisher, B., Packward, B., Read, E.,Carrasquillo, J., Carter, C., Topalian, S., Yang,J., Yolles, P., Larson, S., Rosenberg, S. Tumor localization of adoptively transferred indum-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients With metastatic melanoma. J. clin. Oncol. 7:250-261 (1989).

36.Haranaka. K., Satomi, N., Sakurai. A Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors in nude mice. G. Cancer. 34:263-267 (1984).

37.Creasey, A., Reynolds, M., Laird, W. Cures and partial regression of murine and human tumors by recombinant human tumor necrosis factor. Cancer Res. 46: 5687 - 5690 (1986)