

# Genско zdravljenje (2)

**Radovan Komel**



*V prvem delu tega se-stavka (glej Proteus 61/1, str. 14-23) smo spoznali, kaj je gensko zdravljenje, v čem se zdravljenje telesnih celic razlikuje od posega v človekove klične celice in na kakšne načine lahko gene vnašamo v telesne celice. V nadaljevanju bomo spregovorili o dosežkih na tem področju in o vprašanjih, ki jih bo še treba razrešiti do popolne uveljavitve tega novega načina zdravljenja genetskih bolezni in gen-skih okvar.*

## Dosežki genskega zdravljenja do sedaj

Po letu 1989, ko je bil odobren prvi poskus genskega zdravljenja človeka (šlo je za poskus zdravljenja pomanjkanja adenozijske deaminaze), je bilo samo v ZDA do danes dovoljenih že 170 kliničnih poskusov zdravljenja različnih genetskih bolezni, poskusi po celem svetu pa so zajeli že več kot 1500 bolnikov. Ti klinični poskusi so bili v večini primerov usmerjeni v zdravljenje bolezni, ki kar najbolj ustrezajo večini meril za uspešno gensko zdravljenje. To pomeni, da je bil terapevtski gen kloniran in da tako poznamo njegovo nukleotidno zaporedje, poleg tega pa tudi dobro razumemo način njegovega izražanja. Imeti moramo primeren vektor, ki omogoča dober nadzor nad njegovim izražanjem: še najbolje je, da omogoča nizko, vendar stalno izražanje gena (to je: manjšo stalno količino terapevtske beljakovine v zdravljenih celicah), če pa že pride do povečanega izražanja, naj povečana koncentracija beljakovine ne bi bila škodljiva. Celice, ki jih zdravimo, naj bi bile lahko dostopne in tiste, pri katerih smo uspeli s transdukcijo terapevtskega gena, naj bi imele kakšno selektivno prednost (npr. večjo stabilnost, daljšo življenjsko dobo itd.) pred netransduciranimi. Bolezen, ki jo zdravimo, pa naj bi po možnosti bila enostavnejša monogenska bolezen.

Že omenjeno pomanjkanje adenozijske deaminaze (angl. Adenosine Deaminase Deficiency, ADA Deficiency) je ena od takih bolezni. Gre za redko avtosomno recesivno bolezen, katere vzrok je pomanjkanje oziroma neaktivnost ali slabša aktivnost encima adenozijska deaminaza. To povzroči kopičenje deoksiadenozin trifosfata (dATP), zlasti v T-limfocitih, ki so obrambne celice imunskega sistema. Huda oblika bolezni se kaže kot imunska nezadostnost, za katero so značilne ponavljajoče se virusne, glivične in bakterijske okužbe. Otroci telesno propadajo, imajo stalne hude driske in če bolezen ni zdravljena, izčrpani zgodaj umrejo. Bolezen zdravijo z intravenoznimi injekcijami encima ADA, hujše oblike pa s presaditvijo kostnega mozga. V obeh omenjenih primerih prve uporabe genskega zdravljenja leta 1989 so z retrovirusom, v katerega so vgradili gen ADA, izvedli transdukcijo  $10^{11}$  limfocitov T periferne krvi. Rezultati so bili zelo prepričljivi. Takoj po zdravljenju, ki je potekalo *ex vivo*, se je bolnikoma izboljšal imunski sistem in število okužb je močno padlo. Število gensko popravljenih celic v krvnem obtoku je naraslo in doseglo 25-30% celotne populacije T-limfocitov. Gensko popravljeni limfociti so tudi imeli daljšo življenjsko dobo od nepopravljenih.



## Slovarček manj znanih izrazov

Čeprav je bil postopek genske transdukcije tako velikega števila celic tehnično zelo zahteven, je v pogledu zdravljenja pomenil velik in spodbuden uspeh.

Sledili so poskusi zdravljenja še nekaterih drugih recesivnih monogenih bolezni - družinske hiperholesterolemije, cistične fibroze, pomanjkanja  $\alpha$ 1-antitripsina itd. Družinska hiperholesterolemija, ki prizadene enega od 500 prebivalcev, je posledica okvare celičnega receptorja za plazemski lipoprotein nizke gostote (angl. Low Density Lipoprotein, LDL), ki po krvi do celic prinaša holesterol. Holesterol tako ne more vstopiti v celice, ki bi ga porabile, in ostaja v plazmi, se lepi na notranjo površino arterij in predvsem na njihovih poškodovanih mestih onemogoča celjenje, pogloblja vnetni in degenerativni proces, kar povzroča zožitve kapilar in zastoje v krvnem obtoku. Ker so jetra glavni organ presnove holesterola, so opravili transdukcijo jetrnih celic (hepatocitov). Ker se pri nepoškodovanih jetrnih celice ne delijo, so morali poskusnim bolnikom odvzeti del jeter ter hepatocite gojiti v tkivni kulturi, kjer se delijo. Na ta način so lahko izvedli transdukcijo gena za LDL-receptor z retrovirusnim vektorjem, ki je omogočil stabilno vgraditev terapevtskega gena v genom hepatocitov. Popravljen hepatocite so po katetru vrnili v vhodno jetrno veno in regenerirajoča se jetra so jih sprejela. Tudi ti poskusi so tehnično izredno zahtevni, saj je bilo za uspešno transdukcijo dovolj velikega števila hepatocitov pri vsakem bolniku te potrebno gojiti v več kot 800 petrijevkah. Kljub uspešni transdukciji pa so bili rezultati zdravljenja samo delni, saj je prišlo le do majhnega padca ravni krvnega holesterola, ne da bi ga uspelo znižati na normalno vrednost.

Podobne delno uspešne rezultate so dali tudi poskusi zdravljenja cistične fibroze. Ta pogosta avtosomno recesivna bolezen, ki prizadene enega od 2500 živorojenih otrok, je posledica okvare gena za CFTR-beljakovino kloridnega kanalčka (angl. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR) v membrani celic na površini organov. Zaradi motenega prehajanja kloridnih ionov postanejo izločki na notranji površini nekaterih organov (pljuča, trebušna slinavka, prebavila) nenormalni, pregosti in zelo viskozni. Pride do zamašitev notranjih vodov, ki povzročajo stalno ponavljajoče se okužbe in degenerativne spremembe v tkivih. Med najbolj prizadetimi organi so pljuča, zato so lahko pri poskusih genskega zdravljenja uporabili adenovirusne vektorje in kationske liposome, s katerimi je možno izvajati transdukcijo površinskih celic pljučnega epitelijskega *in vivo*, kar pomeni, da so terapevtske vektorje bolnikom lahko dajali v obliki inhalacij. To s tehničnega vidika nedvomno zelo enostavno in manj zahtevno zdravljenje pa ni imelo trajnejšega učinka, saj uporabljeni vektorji ne omogočajo stabilne vgraditve terapevtskega gena v genom epitelijskih celic. Prehodno izražanje terapevtskega gena je povzročilo rahlo povečanje navzočnosti CFTR-beljakovine v pljučnem epiteliju, vendar ne več kot za 6 tednov, nato pa je bilo treba zdravljenje ponoviti. S ponavljanjem zdravljenja pa je prišlo do zapletov zaradi povečanega imunskega odgovora proti vektorju oziroma njegovim beljakovinom.

- $\alpha$ 1-antitripsin - encim, ki inhibira nekatere proteolizne beljakovine (encime, ki razgrajujejo beljakovine), v tem primeru serinske proteaze, kot so tripsin, kimotripsin, kolagenaza itd. Je pomemben pri uravnavanju delovanja proteoliznih encimov. Pri njegovem pomanjkanju pride že v otroštvu do hudih okvar in odpovedi jeter. Pomanjkanje  $\alpha$ 1-antitripsina se deduje kot avtosomno recesivna bolezen.
- EPISOM - plazmid, ki se lahko v celici podvojuje v citoplazmi in neodvisno od kromosoma, lahko pa se tudi vgradi v njen kromosom in se podvojuje skupaj z njim.
- GANCIKLOVIR - ciklična organska spojina, derivat purina.
- HEMATOPOIETIČNE KLJUČNE CELICE - ključne celice kostnega mozga, ki se diferencirajo v krvne celice.
- IMUNOMODULATOR - molekula, ki vpliva na imunski odgovor organizma.
- INTERLEVKIN-2 - molekula (eden od limfokinov), ki jo izločajo T-limfociti kot odgovor na navzočnost tuje snovi (antigena). Je rastni faktor za limfocite T in B, saj pospešuje rast samih T-limfocitov in izločanje protiteles iz B-limfocitov.
- LIMFOKINI - družina beljakovin (ki med drugim vključuje tudi interlevkine), ki delujejo kot rastni dejavniki (pospešujejo celično rast oziroma diferenciacijo) ali njihovi antagonisti.
- LIZOSOM - z membrano obdan citoplazemski organel, ki vsebuje encime za razgradnjo polimernih biomolekul.
- NUKLEAZE - encimi, ki katalizirajo razgradnjo nukleinskih kislin. Endonukleaze cepijo vezi med nukleotidi v notranjosti nukleotidnih verig, eksonukleaze pa odcepljajo nukleotide s koncev verig. Ribonukleaze so encimi, ki razgrajujejo RNA, deoksiribonukleaze pa DNA.
- PLAZEMSKI LIPOPROTEINI - kompleksne krogljaste združbe polarnih lipidov in beljakovin, ki v notranjosti vsebujejo hidrofobne molekule (maščobe, estre holesterola oz. sam holesterol) in jih prenašajo po krvnem obtoku. Glede na razmerje med polarnimi lipidi in beljakovinami razlikujemo med lipoproteini visoke gostote (angl. High Density Lipoproteins, HDL) in lipoproteini nizke gostote (angl. Low Density Lipoproteins, LDL, oz. Very Low Density Lipoproteins, VLDL).
- PROTOONKOGEN - celični gen, ki navadno kodira kakšno od regulacijskih beljakovin (npr. za uravnavanje delitve DNA oziroma izražanja genov). Z mutacijo se spremeni v onkogen.
- TALASEMIJA - bolezen rdečih krvničk, za katero je značilno pomanjkanje  $\alpha$ - ali  $\beta$ -globina. Deduje se avtosomno recesivno. Posledice so huda kronična anemija, motnje v rasti, telesne deformacije.
- TRANSDUKCIJA - prenos evkariontskih DNA z retrovirusi v celice. Pomeni tudi prenos bakterijskega gena iz ene bakterije v drugo z bakterijskim virusom (fagom).



Ker je bilo v preteklosti že več kot 30 raznih genetskih bolezni uspešno zdravljenih s presaditvijo kostnega mozga, to vzbuja upanje, da bi bilo boleznih, kot sta anemija srpastih celic in  $\beta$ -talasemija (glej Proteus 60/8, str. 346), mogoče še bolj enostavno in uspešno zdraviti z gensko terapijo hematopoetičnih kličnih celic. Za obe bolezni so značilne nepravilne strukture hemoglobina, ki so posledica napak v genih za globinske beljakovine. Za zdaj poskusi še niso zagotovili dovolj močnega in dolgotrajnega izražanja terapevtskih genov, zato razvijajo vektorje, ki bi lahko sprejeli daljše molekule DNA. Med boleznih, ki bi jih bilo mogoče zdraviti s posegom v hematopoetične klične celice, spadajo tudi številne bolezni skladiščenja škodljivih metabolitov presnove v lizosomih, ki bi se sicer razgradili, če ne bi prišlo do pomanjkanja za to potrebnih encimov. Presaditve kostnega mozga so namreč pokazale učinkovitost tudi pri zdravljenju bolezni skladiščenja v krvi in v nekaterih drugih telesnih tkivih, vendar ne v centralnem živčnem sistemu. Zato potekajo intenzivni poskusi transdukcije terapevtskih genov v celice možganov, kar bi bilo primerno za zdravljenje nekaterih hudih progresivnih degenerativnih bolezni centralnega živčevja.

**Primer proučevanja genskega zdravljenja na modelni miški:**  
 Pomanjkanje encima ornitin karbamil transferaza je huda genska bolezen, za katero je značilna navzočnost velike količine zelo toksičnega amoniaka v krvi. Pri zdravem človeku je encim navzoč v mitohondrijih jetrnih in črevesnih celic, kodira pa ga gen, navzoč v kromosomu X. Za hujšo obliko bolezni je značilno popolno pomanjkanje encima, kar povzroči smrt v nekaj dneh ali tednih po rojstvu, blažja oblika pa se pojavi kasneje in z manj dramatičnim potekom. Za to obliko so razvili mišji model za proučevanje genskega zdravljenja, to je miško, ki ima okvarjen gen za omenjeni encim, in z značilno vidno fenotipsko lastnostjo - izrazitim pomanjkanjem dlake. Slika prikazuje uspešno gensko zdravljenje, pri katerem so v moški zarodek modelne miške z mikroinjiciranjem vnesli več kopij nepoškodovanega, terapevtskega gena. Obe miški sta bili fotografirani 15 dni po rojstvu: A) predstavlja nezdravljeno miško, B) transgeno miško, katere fenotip je popolnoma normaliziran.  
 (Po J.-C. Kaplan, M. Delpech: *Biologie Moléculaire et Médecine, Médecine - Sciences Flammarion, 2<sup>e</sup> édition, Paris, 1995*).



Poskusi genskega zdravljenja potekajo tudi pri boleznih mišic, pri katerih v mišične celice neposredno injicirajo terapevtski gen, vgrajen v plazmidni vektor. Mišične celice imajo izredno lastnost, da dovoljujejo daljši obstoj episomske DNA, vendar pa ta zagotavlja samo majhno in prehodno izražanje. V novejšem času si prizadevajo mišične celice osamiti, jih v *in vitro* razmerah modificirati ter ponovno vsaditi v mišično tkivo. Te tehnike za zdaj še ne omogočajo množične obdelave večjega števila celic, so pa rezultati spodbudni, saj so pokazali, da je tudi v mišičnih celicah mogoče za daljši čas zagotoviti izražanje terapevtskih genov.



## Kaj pa zdravljenje raka?

Rak je večgenska bolezen, ki jo povzroči aktivacija (navadno več) protoonkogenov in inaktivacija genov (supresorskih genov), ki zavirajo nastanek tumorjev. Mutacije v teh genih se dogodijo v krajšem ali daljšem življenjskem obdobju, navadno ne v določenem vrstnem redu, temveč je usodna le akumulacija teh dogodkov, ki progresivno pripeljejo do malignega fenotipa. V rakasti celici je preveč onkoproteinov (ki so sicer v normalnih okoliščinah popolnoma normalne in za celico potrebne beljakovine) oziroma so navzoče preveč aktivne beljakovine (onkoproteini), ki imajo zaradi mutacij spremenjeno zgradbo. V obeh primerih celico silijo v nenadzorovano in stalno rast. Zaradi mutacij v zaviralnih genih hkrati ni zaviralnih beljakovin (ali pa so funkcijsko okrnjene), ki bi inhibirale onkoproteine oziroma zavirale izražanje onkogenov. Pri nekaterih oblikah raka mutacije v enem od alelov kakšnega zaviralnega gena lahko podedujemo, tako da govorimo o nagnjenosti do bolezni, ki se bo pojavila, če bo v življenju prišlo tudi do mutacije na drugem alelu in seveda do mutacij v onkogenih (glej Proteus 60/6, str. 258).

Za nadomeščanje zaviralnih beljakovin je primerno gensko zdravljenje z nadomeščanjem, kot smo ga opisali do sedaj. Za vplivanje na onkogene pa tak pristop ni primeren, saj je sicer normalne beljakovine preveč (oziroma je preveč aktivna). Z dodatno gensko dozo bi tako njen neželjeni učinek še povečali. Res je, da bi v primeru, ko bi obvladovali homologno rekombinacijo, odkvarjene gene ali njihova regulacijska (promotorska, aktivatorska in pospeševalna) območja lahko zamenjali z normalnimi, vendar tega danes še ne znamo. Res je tudi, da so pri poskusih genskega zdravljenja srpaste anemije z neposrednim injiciranjem terapevtskega gena v jedro v nekaterih celicah sprožili samopopravljalni mehanizem, ki je po načelu homologne rekombinacije izmenjal okvarjeni genski segment, vendar je bil dogodek redek, ne da bi razumeli, kako in zakaj je do njega prišlo, in tehnično neuporaben za popravljanje velikega števila celic. Zato moramo pri poskusih onesposabljanja onkogenov vplivati na njihovo izražanje.

Metoda nasprotne mRNA (angl. antisense RNA) temelji na uvajanju enoverižne RNA, pri kateri bi nukleotidno zaporedje potekalo v obratni smeri 5'→3', kot je sicer v normalni celični mRNA, s tem, da bi bilo komplementarno normalnemu. Na ta način bi prišlo do nastanka hibridne dvoverižne RNA in vstop normalne mRNA v proces translacije (to je: biosinteze onkoproteina na ribosomih) bi bil onemogočen. Neobičajno dvoverižna RNA bi tudi hitro prepoznali celični obrambni encimi (nukleaze) in jo razgradili. Nasprotne mRNA bi v tumorske celice vnesli z liposomi, potekajo pa tudi poskusi, da bi sintetizirali njih kodirajoče gene, ki bi jih v celice lahko vnesli z retrovirusnimi vektorji. Omenjeni pristop je primeren za lokalno zdravljenje tumorjev, saj bi vnos nasprotne mRNA v zdrave celice lahko povzročil odsotnost normalnega protoonkogenskega produkta, to je normalne beljakovine, ki jo celica potrebuje. Pri tem se srečujemo s podobnim problemom kot pri uporabi citostatikov, ki poleg tumorskih prizadenejo tudi določeno število zdravih telesnih celic.

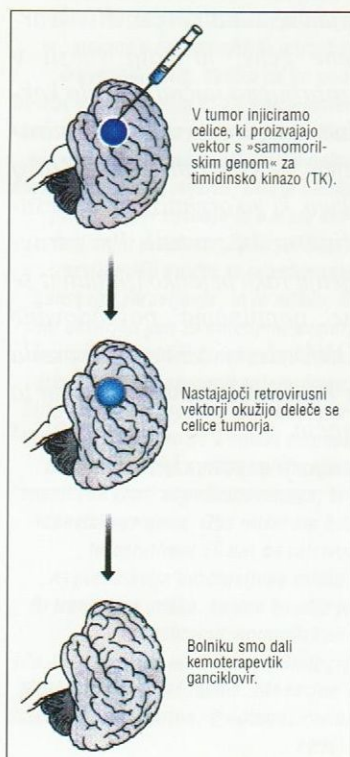
---

*Ob lani klonirani ovci Dolly je postalo jasno, da so znanstveniki odkrili način, kako dednino iz poljubne odrasle celice povrniti v njeno začetno stanje in jo "prisiliti", da bo v izpraznjeni jajčni celici (iz katere so predhodno odstranili njeno DNA) odigrala začetno vlogo pomnoževanja in diferenciacije celic v nov organizem. Bolj kot neetična in nesmiselna vprašanja, ali bomo sedaj kar klonirali ljudi, se postavlja v ospredje možnost kloniranja človeških celic v določena tkiva in v prihodnosti morda tudi v organe. S tem se na široko odpirajo možnosti genskega zdravljenja. Bolnikovo DNA bi lahko osamili iz neke telesne celice, v njej IN VITRO nadomestili ali popravili okvarjene gene, jo nato vnesli v izpraznjeno jajčno ali celo kakšno drugo celico in s kloniranjem IN VITRO pridobili zdravo tkivo, ki ga organizem po presaditvi ne bi zavrnil. Pri zdravljenju raka bi lahko izhajali iz še ne popolnoma poškodovane DNA telesne celice, ki ni prešla v maligno spremembo, in na ta način v celoti nadomestili s tumorjem prizadeti organ.*

---



*Encim timidinska kinaza (TK) je neškodljiva za celico, dokler ta ni izpostavljena njegovemu substratu gancikloviru. Encim TK pripne fosfatno skupino na ganciklovir (ga fosforilira), tako da nastane za celico zelo strupena spojina, ki jo uniči. Če v tumor ali njegovo bližino vbrizgamo celice, ki smo jih poprej zmanipulirali tako, da proizvajajo retrovirusne delce z vgrajenim genom za TK, bodo ti delci okužili izključno deleže se celice tumorja in v njihov genom vgradili gen za TK. Tumorske celice bodo zato začele proizvajati encim TK. Če bolniku nato damo ganciklovir, se bo ta fosforiliriral samo v tumorskih celicah s TK in tako nastali strupeni produkt jih bo uničil. (Po Cox & Sinclair: Molecular Biology in Medicine, Blackwell Science, 1997).*



Podoben pristop je tudi tako imenovana "tripleks strategija", pri kateri v celico vnašamo krajši oligonukleotid z zaporedjem nukleotidov, ki je popolnoma komplementarno eni od verig DNA v območju kakšnega onkogene. Zelo pomembne so raziskave nekaterih nukleotidnih analogov, ki bi vgrajeni v takšen oligonukleotid močno povečali njegovo nagnjenost do vezave na DNA. Omenjeni oligonukleotid naj bi izrabil trenutek, ko se med prepisovanjem DNA v mRNA verigi DNA razpeta, in se vrnil vmes, tako da bi nastala nekakšna troverzižna DNA. S tem bi bil proces transkripcije zaustavljen. Tudi v tem primeru bi morali poskrbeti za to, da ne bi prizadeli izražanja normalnih genov oziroma genov v normalnih celicah.

Vidimo, da je tudi pri poskusih genskega zdravljenja raka eden glavnih problemov pomanjkanje poznavanja posebnih površinskih molekul (tako imenovanih celičnih označevalcev), ki bi rakasto celico popolnoma razlikovale od normalne, tako da bi znali izdelati izredno specifične vektorje, ki bi terapevtsko DNA prenesli izključno samo vanje. Zato potekajo tudi poskusi, da bi rakave celice naredili "vidne" za imunski sistem organizma. To poteka tako, da bolniku odvzamemo nekaj celic tumorja, jih gojimo v celični kulturi in vanje vnesemo gen za beljakovino, ki bi jo telesne celice ubijalke prepoznale kot tujek, ali pa za beljakovino, ki sicer stimulira imunski odgovor organizma. Zmanipulirane celice nato vbrizgamo v tumor in celice ubijalke jih prepoznajo kot tujek. Obenem pa začnejo prepoznavati tudi nezmanipulirane celice tumorja. Imunski odgovor lahko vzbudimo in pospešimo tudi tako, da bolniku iz krvi odvzamemo določeno količino levkocitov, ki se infiltrirajo v tumorje (angl. Tumor Infiltrating Leucocytes, TIL), jim v celični kulturi vcepimo več kopij gena za kakšnega od imunomodulatorjev (npr. za interlevkin-2) in s tem povečamo njihovo imunsko moč ter jih vrnemo bolniku.

Lep primer moči genskega zdravljenja kažejo obetavni poskusi zdravljenja tumorjev centralnega živčnega sistema. Možganski tumor predstavlja skupek hitro delečih se celic, obdan z okoljem normalnega možganskega tkiva iz nedelečih se celic. Neposredno v tumor lahko vbrizgamo pomožne celice, v katere smo poprej vnesli gen za beljakovino, ki je škodljiva za celice, v katerih bi nastala, ko bi se ta gen izrazil. Vbrizgane pomožne celice bodo začele izdelovati retrovirusne vektorje z omenjenim genom, ti pa bodo okužili izključno samo deleže se celice tumorja. Kot smo že omenili, retrovirusi namreč ne morejo okužiti nedelečih se celic: vanje sicer lahko prodrejo, ne znajo pa prodreti skozi jedrno membrano in se tako ne morejo vgraditi v jedrni genom.

## Problemi, ki jih še moramo rešiti

Že dobrih deset let govorimo, da bo gensko zdravljenje "čez nekaj let že stalna medicinska praksa". Rezultate omenjenih nekaj sto kliničnih poskusov, ki so jih opravili do sedaj, v tem trenutku z vso resnostjo preverjajo in razsojajo. Samo v obdobju od januarja do maja letos je v mednarodnih znanstvenih revijah izšlo več kot 600 člankov



o genskem zdravljenju. Za večino opravljenih poskusov velja, da so sicer za krajši čas uspeli pri bolnikih opazno povečati število manjka-jočih beljakovin, v nekaterih primerih so uspeli celo skoraj v celoti normalizirati fenotip, vendar je splošna ocena, da stanje še ne omogoča splošne uporabe tega načina zdravljenja. Še vedno ne razpolagamo z dovolj velikim izborom učinkovitih vektorjev, s katerimi bi bilo mogoče "zadeti" kar največje število bolnih celic, in to po možnosti tako, da bi postopek izvedli *in vivo*, ne da bi pri tem prizadeli zdrave celice organizma. Tudi pri najboljših retrovirusnih vektorjih še vedno ostaja dvom o njihovi varnosti, čeprav pri dosedanjih poskusih niso naleteli na problem insercijske mutageneze. Ni namreč mogoče izključiti možnosti, da se je tak vektor (ki se vgradi v genom naključno, v poljubna mesta v DNA) vgradil v bližino pomembnih genov, kjer sicer trenutno "spi", lahko pa se bo ob ugodnih okoliščinah po daljšem obdobju vzbudil in motil izražanje pomembnih bližnjih genov. Zato bo za dokončno ovrednotenje zelo obetavnih prvih poskusov genskega zdravljenja z retrovirusnimi vektorji potrebnih še nekaj let temeljitega preučevanja. Varnejši sistemi za stabilnejši (časovno daljši) zunajkromosomski način izražanja terapevtskih genov še niso dovolj razviti. Pri uporabi nekaterih drugih virusnih vektorjev se lahko pojavijo imunski problemi, saj te vektorje (oziroma njihove beljakovine) ob daljši stalno ponavljajoči se uporabi telo začne prepoznavati kot tujek in zato zavračati, še preden so opravili svojo nalogo - biosintezo terapevtske beljakovine. Uporaba liposomov obeta veliko, vendar usode DNA, ko se ta izlije v celico, za zdaj še ne znamo natančno predvideti (jo bodo celični encimi razgradili, bo šla v celično jedro, se bo vgradila v genom?) in proces imeti pod nadzorom. Pri sedaj uporabljanemu načinu, ko poskušamo v omejenem številu "zadetih" celic spodbuditi čim večjo produkcijo terapevtske beljakovine, se lahko pojavi tudi nevarnost, da bo (pre)velika navzočnost te beljakovine v celici podrla beljakovinsko ravnotežje in usodno vplivala na celično presnovo. Še mnogo se moramo naučiti o uravnavanju izražanja posameznih genov in spoznati, zakaj se številne genetske bolezni kljub enakemu genotipu (isti vrsti mutacije v istem genu) pri različnih ljudeh izražajo različno. Znanje o večgenskih boleznih in o vzajemnem, orkestriranem uravnavanju delovanja številnih genov je še zelo pomanjkljivo. Isto velja za mehanizme homologne rekombinacije. Ko jih bomo enkrat znali sprožiti, voditi in nadzorovati po vnosu terapevtske DNA v organizem, bo mogoče natančno izmenjevati ne samo gene, temveč celo samo odseke DNA, ki so okvarjeni, in to brez stranskih učinkov. To je tudi končni cilj genskega zdravljenja.

Kljub vsemu lahko v tem trenutku že z večjo gotovostjo rečemo, da je gensko zdravljenje že tu in da bo v prihodnjih letih počasi začelo vstopati v klinično prakso. Silovit napredek molekulske biologije in genske tehnologije, ki mu komaj še sledimo, je dobro zagotovilo, da se bo to tudi uresničilo. ■

## LITERATURA:

- Cooper, M.G., 1997: The Cell - A Molecular Approach. ASM Press, Washington, D.C.
- Cox, T. M. & J. Sinclair (eds.), 1997: Molecular Biology in Medicine. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Komel, R., 1996: Gene therapy in the liver. In: 4th Hepatobiliary School - Book of Lectures and Abstracts (S. Markovič, E. M.Gadžijev, V. Sojar, eds). Hepatobiliary School, Faculty of Medicine, Medical Center, Ljubljana.
- Komel, R., 1996: Metode tehnologije rekombinantne DNA pri raziskavah genoma človeka. V: Biotehnologija (P. Raspor, ur.), BIA d.o.o., Ljubljana, str. 331-346.
- Lever, A. M. L. & P. Goodfellow (eds.), 1995: Gene Therapy. British Medical Bulletin, vol. 51. Churchill Livingstone, N.Y.
- Weatherall, D. J. (ed.), 1991: The New Genetics and Clinical Practice. Oxford University Press, Oxford.
- Wolf, J. A. (ed.), 1994: Gene Therapeutics - Methods and Applications of Direct Gene Transfer. Birkhäuser, Boston.