خودآموزی

ژن درمانی

دکتر مجتبی سرکندی

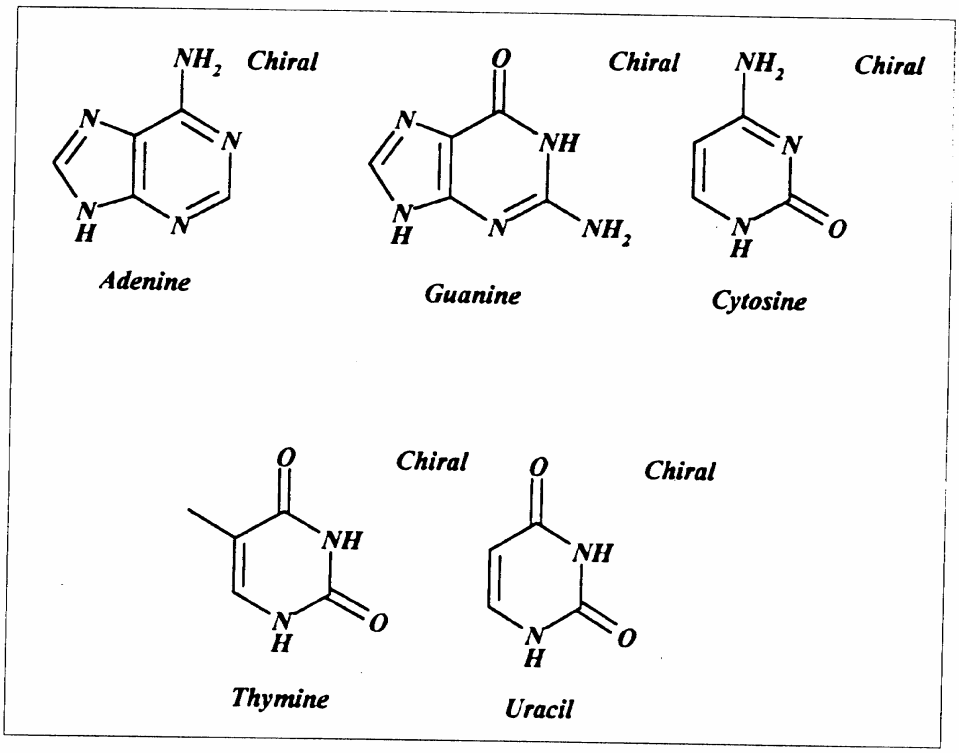
درک ساختمان اسید نوکلئیک، ساختار ژنتیک و عملکرد ژن پایه‌ای برای کاربرد بالقوه ژن درمانی می‌باشد. از این رو، بحث کوتاهی در مورد شیمی اسید نوکلئیک، ساختار DNA (دئوکسی ریبونوکلئیک اسید)، RNA (ریبونوکلئیک اسید) و ژن‌ها به عنوان مروری بر آموخته‌های قبلی و جهت‌گیری مقاله ضروری به نظر می‌رسد.

RNA و DNA پلی‌مری از نوکلئوتیدها می‌باشند. این نوکلئوتیدها از باز، قند و فسفات تشکیل یافته‌اند. بازهای موجود در DNA دارای ساختمان پورینی (آدنین و گوانین) و پریمیدینی (سیتوزین و تیمین) هستند. بازهای موجود در RNA عبارتند از: آدنین، گوانین، سیتوزین و اوراسیل [شکل ۱]. باز چهارم در DNA یعنی تیمین را می‌توان ۵-متیل اوراسیل نامید. بنابراین، تنها اختلاف بین اوراسیل و تیمین، وجود یک گروه CH_3 بر روی کربن شماره ۵' می‌باشد. حضور تیمین در DNA، باعث پایداری معنی دار در مواد ژنتیک می‌شود.

بخش قندی در اسیدهای نوکلئیک جز مهمی از ساختار اسید نوکلئیک است. باز در کربن ۱' به قند متصل می‌گردد. در RNA، قند ریبوز دارای یک گروه OH در کربن‌های ۲' و ۳' می‌باشد. آب باعث شکستن قند ریبوز در واکنش غیرآنزیمی می‌شود. قند DNA، دئوکسی ریبوز (دئوکسی = بدون اکسیژن) است که بر روی کربن ۳'، یک گروه OH قرار دارد اما بر روی کربن ۲' فقط یک هیدروژن (H) وجود دارد. عدم وجود اکسیژن در این قند باعث تغییرات مهمی در خواص آن می‌شود. یکی از این موارد، عدم توانایی آب برای شکستن این قند است که این عامل باعث پایداری DNA در داخل بدن، که بیش از ۷۵ درصد آن را آب تشکیل می‌دهد، می‌گردد.

گروه‌های فسفات در دو جایگاه به ملکول قند اتصال می‌یابند: کربن ۵' و کربن ۳'. بدین ترتیب، بخش قندی مانند پلی بین دو گروه فسفات و باز عمل می‌کند.

DNA به صورت مارپیچی دوگانه (Double helix) در ساختمان دوم آرایش می‌یابد. دو زنجیره DNA را می‌توان به شکل دو پلکان حلقوی بافته شده در یکدیگر تجسم کرد که دارای ساختمان آنتی پارالل (Antiparallel) می‌باشد، یک زنجیره دارای جهت ۳' → ۵' و زنجیره دیگر دارای جهت ۵' → ۳' است. بخش قندی - فسفات ملکول در بیرون مارپیچ دوگانه قرار می‌گیرد و پیکر بندی DNA (DNA backbone) نامیده می‌شود. بازهای DNA در داخل مارپیچ دوگانه و نزدیک به هم قرار می‌گیرند و با پیوند هیدروژنی به یکدیگر



شکل ۱

متصل می‌شوند. پیوند هیدروژنی بین گروه‌های آمینو (NH_2) و کتونی (C=O) خارج سلولی و نیتروژنهای حلقوی که دارای هیدروژن هستند، صورت می‌پذیرد. هیدروژن گروه آمینو بار مثبت دارد، در حالی که اکسیژن گروه کتونی یا نیتروژن حلقوی دارای بار منفی می‌باشند.

بررسی‌های ساختمانی بیانگر آن است که آدنین با تیمین دو پیوند هیدروژنی و گوانین با سیتوزین سه پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهد. جفت بازهای طبیعی معمولاً شامل یک باز پیریمیدینی و یک باز پورینی می‌شود. این پیوند بین یک باز طویل و یک باز کوچک تشکیل می‌گردد.

اهمیت بیولوژیک ساختمان DNA طی بررسی‌های ژنتیکی و کروموزومی مشخص گردید. این مطالعات بیانگر استقرار کروموزوم درون هسته و کشف این مطلب بود که اطلاعات وراثتی سلول درون کروموزوم قرار دارند. مطالعات بیشتر نشان دادند که ژن‌ها (بر روی کروموزوم‌ها قرار دارند) ویژگی جسمانی

انسان را مشخص می‌سازند. محل استقرار ژن بر روی کروموزوم به طور کامل اختصاصی است.

یک پیشرفت مهم در درک ما از ساختمان و عملکرد اسیدهای نوکلئیک مربوط به فرضیه «یک ژن ـ یک آنزیم »می‌باشد. این نظریه بیانگر آن است که هر ژن (Gene) بیان یک آنزیم را کنترل می‌کند (ژن ۱ برای آنزیم ۱؛ ژن دو برای آنزیم ۲؛ ژن ۱۰۰۰ برای آنزیم ۱۰۰۰ و...) و هر ژن فقط مسؤول آنزیم خودش است (ژن ۲ نمی‌تواند آنزیم ۱ را کنترل کند). بنابراین، اگر عاملی باعث از بین رفتن ژن ۱ شود، سلول آنزیم ۱ را از دست می‌دهد.به عبارت دیگر، ژنی که حاوی اطلاعات لازم برای سنتز انسولین می‌باشد، نمی‌تواند برای تولید آدرنالین به کار رود و بر عکس.

علی رغم فرضیه اولیه «یک ژن ـ یک آنزیم»، کاملاً آشکار است که این عبارت باید به صورت «یک ژن ـ یک محصول» اصلاح شود، زیرا تمامی پروتئین‌ها آنزیم نیستند و ممکن است وظایف دیگری (ساختاری، هورمونی، بهبود زخم و...) داشته باشند. این انتقال اطلاعات ژنتیک به عنوان «اصل مرکزی» (Central dogma) خوانده می‌شود که به اختصار بیان کننده انتقال اطلاعات ژنتیک از سکانس‌های نوکلئوتید در DNA به سکانس‌های قابل مقایسه در RNA می‌باشد. در نتیجه RNA_m (RNA پیامبر) که برای تولید یک پروتئین به کار می‌رود، منعکس کننده اطلاعات در ژن DNA (DNA gene) می‌باشد. این فرآیند شامل یک انتقال از هسته به سیتوپلاسم است. به علاوه، اصل مرکزی در برخی شرایط خاص با انتقال اطلاعات از RNAبه DNA معکوس می‌شود که از ویژگی‌های RNA در تومور ویروس‌ها می‌باشد که با آنزیم ترانس کریپتاز ریورس (Reverse transcryptase) کاتالیز می‌گردد و مستقیماً در HIV دخیل است.

الفبای ژنتیک که در انتقال اطلاعات به کار می‌رود از چهار حرف تشکیل یافته است: A، C، G و T. کد ژنتیکی که با استفاده از این الفبا به وجود می‌آید یک سری از بازهای سه گانه RNA است که هر کدام آنها مکمل باز DNA می‌باشند. بنابراین، اگر سکانس یک DNA, AGCTAGCT باشد، سکانس در RNA_m بدین صورت است: UCGAUCGA. آنزیم RNA پلیمراز سنتز RNA_m را کاتالیز می‌کند.

انواع RNA

RNA ریبوزومی(RNA_r)ـ RNA ریبوزومی با تعداد زیادی پروتئین‌های مختلف ترکیب شده و ایجاد ریبوزوم‌ها را می‌نمایند که نقش اصلی را در بیوسنتز پروتئین‌ها به عهده دارند.

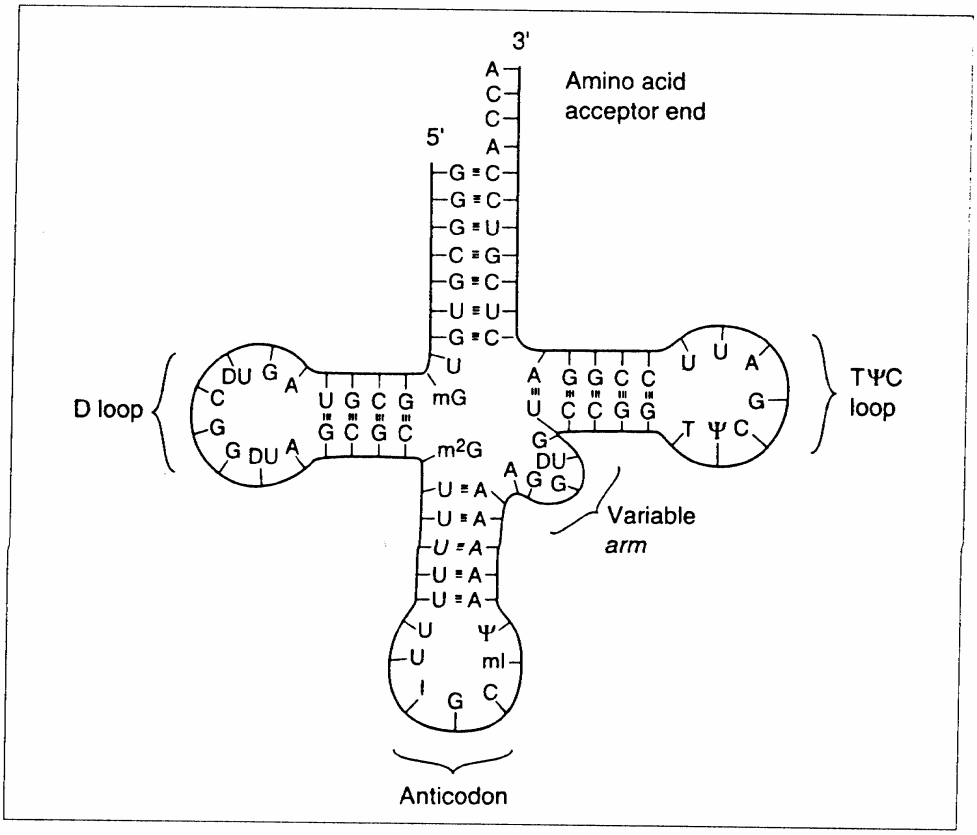
RNA حامل(RNA_t)ـ RNA حامل حمل اسیدهای آمینه در داخل سیتوپلاسم را به عهده دارد. اسیدهای آمینه بدین طریق به طرف ریبوزوم حمل می‌شوند و سپس بر روی ریبوزوم پلی‌مریزه شده و زنجیر پلی‌پپتیدی را می‌سازند.

برای هر نوع اسید آمینه یک یا چند RNA حامل وجود دارد که از لحاظ ساختمانی با یکدیگر

خودآموزی

متفاوت می‌باشند.در ساختمان RNA حامل علاوه بر چهار نوکلئوزید اصلی که در تمام RNA یافت می‌شوند، تعداد نوکلئوزیدهای دیگر مانند پزودواوریدین اینوزین، دی‌هیدروکسی اوریدین، متیل‌آدنوزین و متیل‌گوانوزین و گاهی نوکلئوزیدهایی که حاوی بازهای گوگرددار می‌باشند، وجود دارند. در ساختمان یک مولکول RNA حامل وجود متجاوز از ۲۰ پیوند هیدروژنی داخل مولکول موجب پیدایش تاخوردگی‌هایی می‌گردد و این تاخوردگی‌ها با ایجاد چهار بازو شکل یک برگ شبدر (Clovrleaf) را به مولکول RNA حامل می‌دهند. در هر بازوی RNA حامل در اثر قرار گرفتن بازهای مکمل در مقابل یکدیگر ساختمان دوم مستحکمی به وجود می‌آید.

RNA حامل در انتهای ۳' بازوهای فوقانی خود به سه باز C-C-A- ختم می‌شوند، همیشه ریبوز اسیدآدنیلیک انتهایی در حمل اسیدهای آمینه شرکت می‌نماید.



شکل ۲ ـ ساختمان RNA حامل

بازوی مجاور انتهای ´۳ در تمام انواع RNA حامل حاوی بازهای T-ψ-C- می‌باشد و آن را بازوی پزودواوریدین می‌نامند. این بازو در اتصال آمینواسیل ـ RNA_t به سطح ریبوزومی در محل سنتز پروتئین شرکت می‌کند.

بازوی مجاور انتهای ´۵، بازوی دی‌هیدرواوریدین خوانده می‌شود و محل مهمی برای تشخیص مناسب یک RNA_t توسط آمینواسیل ـ RNA_t سنتاز می‌باشد و بالاخره بازوی تحتانی یا بازوی آنتی کدون شامل سه باز ویژه می‌باشد که بر حسب نوع اسید آمینه‌ای که باید حمل شود، در انواع RNA حامل متفاوت است. این سه باز در پیوند با RNA پیامبر نقش مهمی را دارا می‌باشند.

RNA پیامبر (RNA_m) ـ نقش این RNA، حمل اطلاعات توارثی است که به صورت رمز یا کدون از DNA به ریبوزوم‌ها انتقال می‌یابند. وزن ملکولی آن متناسب با وزن ملکولی پروتئینی است که سنتز آن را به عهده دارند.

انتهای ´۵ آنها توسط یک کلاهک ۷ ـ متیل گوانوزین‌تری فسفات پوشیده شده و این کلاهک خود توسط سومین ریشه فسفات خود یا گروه هیدروکسیل ´۵ به یک ملکول ۲ ـ متیل‌اکسی ریبونوکلئوزید متصل است. این کلاهک در شناسایی ملکول RNA_m توسط ریبوزوم نقشی به عهده دارد.

در انتهای دیگر RNA_m نیز (انتهای ´۳) یک پلیمر ریشه آدنیلات (دم پلی A) وجود دارد که احتمالاً در پایداری ملکول RNA_m در داخل سلول مؤثر می‌باشد.

RNA ناهمگن هسته‌ای (hnRNA) ـ RNA ناهمگن هسته‌ای ملکولی بسیار بزرگ می‌باشد و علاوه بر قطعات نوکلئوتید حاوی رمز، دارای توالی‌های نوکلئوتیدی است که حاوی هیچ گونه رمز (کد) برای هیچ نوع اسیدآمینه‌ای نمی‌باشد. این گونه توالی‌ها که اینترون (Intron) نامیده می‌شوند طی مراحل تکامل یافتن ملکول RNA و قبل از این که ملکول‌های RNA_m از هسته به داخل سیتوپلاسم سلولی انتقال یابند از ملکول جدا می‌گردند تا قطعات حاوی رمز یعنی اکسون‌ها (Exons) در مجاورت یکدیگر و به دنبال هم قرار گیرند.

هر کدام از کدهای ژنتیکی سه‌گانه RNA یکی از ۲۰ اسید آمینه طبیعی را مشخص می‌کند. به‌عنوان مثال، UUU مشخص کننده اسید آمینه فنیل آلانین می‌باشد. با استفاده از این چهار حرف الفبا می‌توان ۶۴ کد سه گانه ساخت که به آنها کدون (Codons) می‌گویند و بنابراین، هر اسیدآمینه با بیش از یک کدون مشخص می‌گردد. به علاوه، یک کدون به عنوان علامت شروع (AUG) و سه کدون به عنوان علامت پایان (UAA، UGA و UAG) به کار می‌روند. پس از انتقال RNA_m به ریبوزوم‌ها در سیتوپلاسم، اطلاعات آن به پروتئین ترجمه می‌شود. این فرآیند شامل نوع خاص دیگری از RNA به نام RNA حامل می‌باشد. این ملکول دارای دو وظیفه می‌باشد. ابتدا، با کاربرد سه باز به طور اختصاصی به کدون‌ها اتصال می‌یابد که این عمل

در آنتی کدون صورت می‌پذیرد و جایگاه آن در لوپ آنتی کدون می‌باشد. این اتصال با پیوند هیدروژنی مشخص می‌شود. در انتهای دیگر ملکول، در ریشه پذیرنده (Acceptor stem)، RNA حامل به اسید آمینه‌ای که با آن کدون مشخص می‌گردد، اتصال می‌یابد. بنابراین، اگر کد سه‌گانه در RNA_m، UUU باشد، ناحیه آنتی کدون در RNA_t، AAA است و اسید آمینه انتخابی توسط RNA_t فنیل آلانین می‌باشد. ۲۰ نوع RNA_t مختلف وجود دارد و هر کدام برای یک اسید آمینه اختصاصی است.

کارخانه سلولی که در آن پروتئین ساخته می‌شود، ریبوزوم نام دارد که به RNA_m اتصال می‌یابد. برای ساخت یک پروتئین، هر کدام از ملکول‌های RNA_t بر حسب ترتیب خاصی که توسط کدهای سه گانه درون RNA_m مشخص می‌گردد به اسیدآمینه متناظرش اتصال می‌یابد و در انتهای دیگر اسیدهای آمینه در یک زنجیره آرایش می‌یابند. در همین حال، آنزیم پپتیدین ترانسفراز تشکیل پیوند پپتیدی بین اسیدهای آمینه را کاتالیز می‌کند و پروتئین خاص سنتز می‌شود. ترتیب اسید آمینه درون پروتئین با ترتیب کدون در RNA_m مشخص می‌گردد و مشخص کننده ترتیب اتصال ملکول‌های RNA_t نیز می‌باشد.

روشهای ایجاد DNA نوترکیب

توانایی ما برای به کارگیری رژیم‌های ژن درمانی، ثمره مستقیم توسعه و گسترش فن‌آوری ملکولی بوده و می‌باشد. به ویژه، قابلیت جداسازی ژنهای منفرد و سپس دستکاری در بیان آنها اساسی برای ژن درمانی می‌باشد. در این بخش، به اختصار چند روش برای بررسی ساختمان - عملکرد ساختار ژنتیکی بیان می‌گردد.

سه پروتکل در شکل [۳] مشخص گردیده است که هر سه تای آنها بر اساس جدا سازی پروتئین مورد علاقه می‌باشد. از نظر تاریخی، تولید آنتی بادی منوکلونال یا پلی‌کلونال اولین مرحله در این فرآیند بود. این آنتی بادی‌ها برای غربالگری کتابخانه‌های DNA_c موجود در باکتریها برای سلولهای منفردی که یک پروتئین فعال ایمنی را بیان می‌کند، به کار می‌رود. پس از جدا سازی کلنی سلولی متناظر، معمولاً با رقیق سازی محدود، DNA_c (که آن محصول را مشخص می‌کند) جدا می‌گردد و سکانس نوکلئوتید آن با پروتکل‌های ژل الکتروفورتیک و به کارگیری دی دئوکسی نوکلئوتیدها در واکنش DNA پلی مراز مشخص می‌گردد.

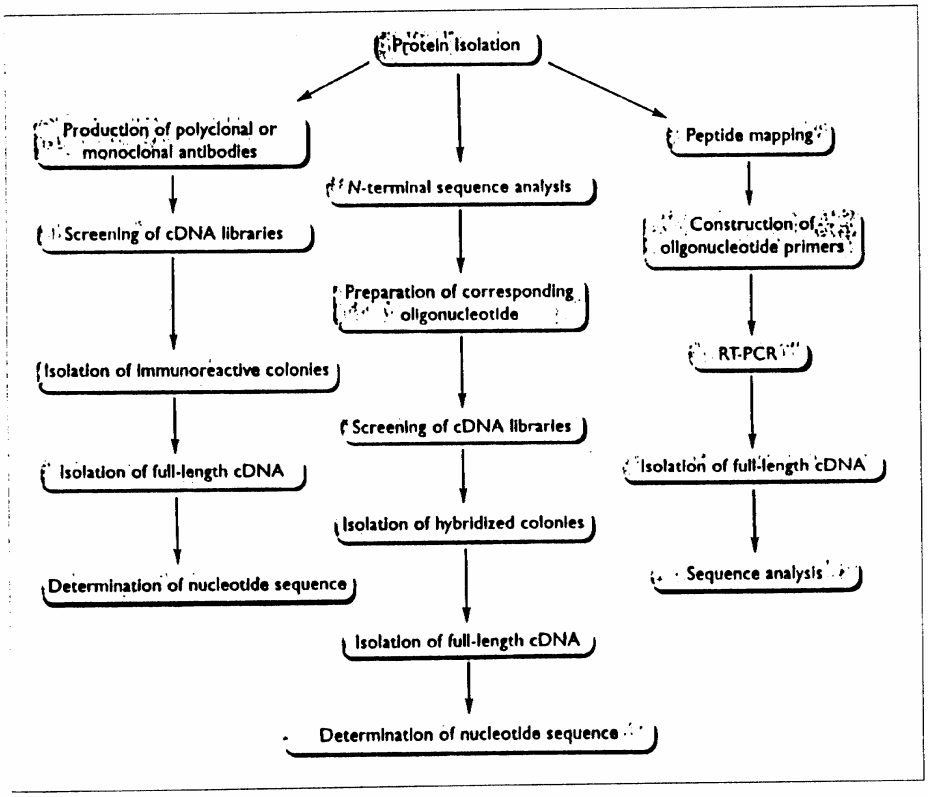
بهبود در فن‌آوری باعث شد تا سنتز سکانس‌های اولیگونوکلئوتید حاوی بازهای DNA که سکانس اسیدآمینه N-ترمینال پروتئین را انکدمی کنند، صورت پذیرد. این سکانس‌ها با 33P رادیولیبل می‌شوند و در مطالعات هیبریداسیون برای تعیین حضور سکانس ژن در کتابخانه DNA_c به کار می‌روند. این روش بیانگر یک اصلاح معنی‌دار در روشهای مطالعات ژنتیک می‌باشد. مطالعات آنتی بادی مذکور نیاز به سنتز پروتئین‌های فعال ایمنی دارد و بنابراین

خودآموزی

تعداد کلنی‌های شناسایی شده را کاهش می‌دهد. استفاده از اولیگونوکلئوتیدهای رادیولیبل منجر به حذف سنتز پروتئین‌های فعال ایمنی می‌شود. در حال حاضر، شناسایی یک سکانس ژنتیک بدون رونویسی و ترجمه $mRNA$ به پروتئین امکان‌پذیر است. این پروتکل ضرورت تولید آنتی‌بادی، فاصله طولانی برای تولید و مشخص کردن آنها را از سر راه برداشته است.

یکی از روشهای جدیدتر برای جداسازی ژن، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز [Polymerase chain reaction (PCR)] است. این پروتکل از DNA پلی مراز Theramus aquaticus و پرایمرهای اولیگونوکلئوتید ۵' و ۳' استفاده می‌کند و می‌توان با کمک آن بخشی و یا کل DNA را با کمک قسمت مشخصی از DNA سنتز کرد.

RT-PCR (ترانس کریپتاز: RT) باعث پیشرفت و بهبود روش PCR گردید. این روش، ضرورت

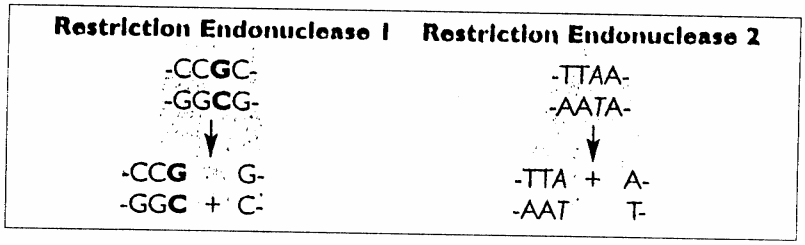


شکل ۳ ـ استراتژی‌های جداسازی ژن

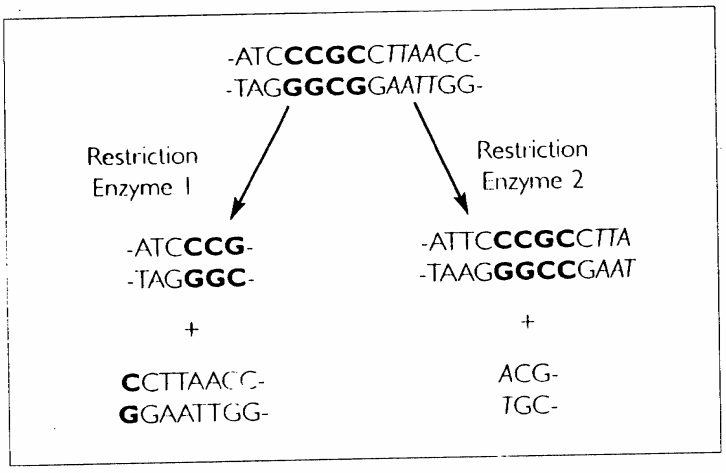
وجـود یک نـمونه DNA را بـا بـه کـارگیری RT برای سنتز یک رونوشت DNA از نـمونه RNA_m بـرطرف مـی‌سازد. یک پـروتکل تـجربی قـدیمی کـه در ایـن مـطالعات بـه کـار مـی‌رود، قـابلیت هـضم DNA در سکـانس خـاصی و بـنابرایـن جـداسـازی بـخش مـعینی از DNA مـی‌باشد. ایـن فـرآیـند در دهـه ۴۰ مـیلادی آغـاز شـده (هم زمـان بـا تکـامل اسـتراتـژی‌های آنـتی‌بادی برای جداسازی ژن‌های معین) و گسـترش یـافته بود.

مطالعات قبلی بیانگر آن هستند کـه آلودگی موفقیت‌آمیز باکتریوفاژها نیاز بـه تـزریق DNA فاژ در بـاکـتری دارد کـه بـه دنـبال آن بـتوان از ماشین رونویسی و ترجمه باکتری برای غلبه بـر خودش استفاده کرد. این مطالعات نشان دادند که باکتری‌ها دارای آنـزیم‌های اخـتصاصی هسـتند که به عنوان مکانیسم دفاعی داخل سـلولی عـمل مـــی‌کنند. ایـن پـروتئین‌ها (انـدونوکلئازهای بازدارنده)، DNA باکتریوفاژ را هضم می‌کنند و از آلودگـی مـوفقیت‌آمیز جـلوگیری بـه عـمل می‌آورند. بـه عـلاوه، هـر آنـزیم بـازدارنـده یک ویژگی سکـانسی مـنحصر بـه فـرد را مشـخص می‌سازد. مثال‌های فرضی در شکل [۴] مشخص شده‌اند. آنزیم‌های باز دارنـده ۱ و ۲، DNA را در سکـانس‌های مشـخص هـضم مـی‌کنند و مـنشا DNA در این موارد مهم نـیست بـلکه عـامل مـهم سکانس است. بنابراین، این آنـزیم‌ها را مـی‌توان برای هر نوع DNA استفاده کرد. ایـن آنـزیم‌ها را می‌توان به صورت گسترده خالص کرد. آنها بـه آسانی و به صورت تجاری در دسترس هستند و به عـنوان واکـنشگر بـرای آنـالیز DNA بـه کـار می‌روند. الگویی در شکل [۵] ارایه شده است کـه در آن یک قطعه DNA حاوی جـایگاهی بـرای دو آنزیم باز دارنده ۱ و ۲ می‌باشد. این شکل بیانگر آن است که چگونه هر آنزیم برای هضم DNA به قطعات که برای پـروتکل‌های الکـتروفورتیک بـه کار می‌رود، استفاده می‌شود.

این آنزیم‌ها برای ایجاد کتابخانه‌های DNA_c استفاده می‌شود. RT برای ساخت رونوشت‌های DNA (DNA مکمل یا DNA_c) با استفاده از نمونه RNA_m به کار می‌رود. ایـن DNA_c مـی‌توانـد بـه طور تصادفی با یک آنزیم بازدارنده ویژه هضم شود.



شکل ۴ ـ مکانیسم عمل اندونوکلئازهای بازدارنده



شکل ۵ـ استفاده از آنزیم‌های بازدارنده در آنالیز DNA

DNA بریده شده که از اندازه‌های گوناگون تشکیل یافته است، به باکتریوفاژی که حاوی جایگاه بازدارنده منحصر به فرد است، وارد می‌شود. بدین ترتیب، یک DNA هیبرید تشکیل می‌شود که ترکیبی از DNA باکتریوفاژ با DNA ارگانیسم دیگری می‌باشد و به نام پلاسمید نوترکیب خوانده می‌شود، این ملکول به وجود آمده برای آلودگی یک باکتری (میزبان) استفاده می‌گردد. در مراحل اولیه، باکتریوفاژ λ به کار می‌رفت، زیرا نقشه ژنتیک آن به طور کامل مشخص بود.

این فن‌آوری‌های جدید، دست کاری ژنوم سلولی را تا حد زیادی امکان‌پذیر می‌سازند.

اساس ژن درمانی

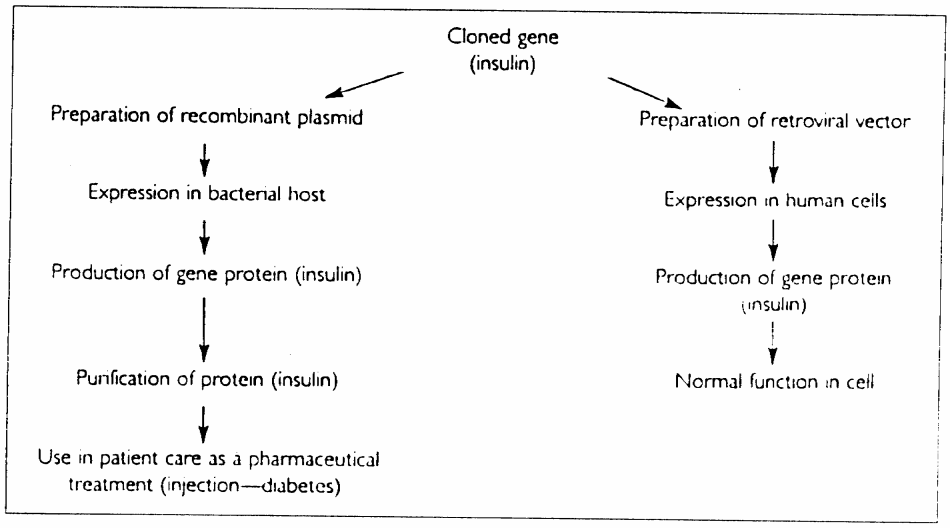
اساس ژن درمانی از قابلیت جداسازی ژنهای منفرد (همان گونه که قبلاً ذکر شد)، کاربرد فن‌آوری پلاسمید برای افزودن آنها به سلول زنده و استفاده از دستگاهی از سلول برای رونویسی یک $mRNA$ از آن ژن و به دنبال آن ترجمه به پروتئین منشا گرفته است. در شاخه دست چپ شکل [۶]، ژن جدا شده (انسولین انسانی) وارد پلاسمید باکتری می‌شود که برای آلودگی سلول باکتری به کار می‌رود. این سلول از بین نمی‌رود اما هنگامی که رشد پیدا می‌کند، ژن انکد شده توسط پلاسمید را بیان می‌دارد. در این مورد، پروتئین مشخص شده با ژن کلن شده در مقادیر زیادی تولید می‌گردد که می‌توان آن را با کروماتوگرافی سنتی بیوشیمیایی تخلیص کرد و منبعی قابل اطمینان برای پروتئین معینی به‌وجود آورد. از طریق این روش می‌توان صاحب منبع جدیدی برای انسولین جهت درمان

خودآموزی

دیابت گردید. ژن کلن شده انسولین انسانی وارد پلاسمید می‌شود و سپس این پلاسمید وارد باکتری می‌گردد. باکتریها مقادیر زیادی از انسولین انسانی تولید می‌کنند که خالص می‌گردد و برای کاربرد درمانی در دسترس است. انسولین نوترکیب انسانی برای مداوای بیماران در دسترس است و از انسولین‌های حیوانی قابل اطمینان‌تر می‌باشد. بنابراین، در این موارد، باکتریها به عنوان کارخانه زنده‌ای برای تولید پروتئین انسانی عمل می‌کنند و می‌توان این پروتئین را برای بیماران تجویز کرد.ژن درمانی بیانگر استراتژی مشابهی برای کاربرد ژن‌های کلن شده در مداوای بیماران (شاخه دست راست شکل ۶) می‌باشد. در این مورد، ژن جدا شده وارد یک پلاسمید نوترکیب به نام حامل (Vector) می‌شود که قابلیت آلوده کردن سلول انسان (بیمار) را دارد و استفاده از سلول‌های انسانی برای تولید این پروتئین را به صورت مستقیم امکان‌پذیر می‌سازد و نیاز به بیان در باکتری، تلخیص پروتئین و تجویز به بیماران را مرتفع می‌سازد.

برای به کارگیری ژن کلن شده در معالجه بیماران نیاز به سه عامل ضروری است که عبارتند از: ۱ـ توسعه پلاسمیدهای نوترکیب، ۲ـ روشهای آلوده سازی سلول‌های بیماران و ۳ـ تعیین بیان ژن متناظر در سلول‌های هدف.

هر چیزی در زندگی فوایدی و مضراتی دارد. به عنوان مثال، ویروس AIDS (HIV) برای انسان بسیار خطرناک می‌باشد. مکانیسم ابتدایی HIV، آلودگی‌های سلول‌های هدف با الحاق ژنوم HIV



شکل ۶ـ استراتژی‌های مورد استفاده در ژن‌های جدا شده

به DNA میزبان توسط رونویسی معکوس می‌باشد. بدین ترتیب، HIV دارای توانایی لازم برای به کارگیری دستگاه‌های بیوسنتتیک سلولی، سنتز پروتئین‌های خودش و تولید بیماری‌زایی را دارا است.

فن‌آوری DNA نوترکیب فرصتی برای تبدیل این موقعیت بد به شرایط خوبی برای درمان می‌باشد. در این روش، اندونوکلئازهای بازدارنده برای آرایش مجدد ماده ژنتیک رتروویروس مشابه با الگوی Erector یا Lego به کار می‌روند. در این استراتژی، ژن‌ها برای ورود به سلول و آلوده کردن میزبان حفظ می‌شوند. با این وجود، ژنهای ویروسی «مضر» حذف می‌گردند و از بیماری جلوگیری به عمل می‌آید. ژن انتخابی (انسولین انسانی) را به گونه‌ای که تحت کنترل عناصر تنظیمی رتروویروس باشند،وارد می‌کنند. از طریق این فرآیند، یک ارگانیسم نوترکیب تولید می‌شود که قادر است سلول انسانی را آلوده کند، اطلاعات ژنتیک را به ژنوم سلول انسانی انتقال دهد و مشابه ژنوم رتروویروسی، طی تقسیم سلولی تکثیر یافته و اطلاعات آن به سلول‌های دختری انتقال پیدا می‌کند.

دو روش اصلی برای «آلودگی» سلول‌های انسانی با پلاسمید رتروویروسی نوترکیب وجود دارد. روش اول، به صورت ex vivo می‌باشد. در این پروتکل، سلول‌ها از بدن بیماران خارج می‌گردند، به صورت in vitro درمان می‌شوند، سپس به فرد باز گردانده می‌گردند. در حال حاضر، این روش ممکن است ساده‌ترین راه باشد. به عنوان مثال، لنفوسیت یک بیمار ممکن است برداشته شود، معالجه گردد و سپس دوباره به فرد تزریق گردد.

روش دوم به صورت in vivo است. در این پروتکل، بیماران به طور مستقیم با پلاسمید نوترکیب معالجه می‌گردند و پلاسمید با روش‌های مکانیکی به بافت هدف وارد می‌شود که در حال حاضر مشکلاتی در این موارد وجود دارند.

ژن درمانی و مراقبت از بیماران

اولین موارد استفاده از ژن درمانی، کاربرد آن در مراقبت‌های حمایتی و پیش‌گیری از بیماری بود. این موارد شامل جایگزین ساختن پروتئین ناکارآ (Unfunctional) به منظور برقراری مجدد عملکرد طبیعی سلول می‌باشد. اصلاح فارماکولوژیک فعالیت آنزیم به منظور افزایش اثربخشی درمان، تحریک پاسخ ایمنی با افزایش تولید آنتی‌بادی و سمیت‌زدایی مواد مضر با افزایش غلظت آنزیم‌ها است.

جایگزین ساختن پروتئین ناکارآ احتمالاً نقطه آغازی برای ژن درمانی می‌باشد. هموفیلی به خاطر اختلالهای ژنتیک است که در آن یک پروتئین خاص انعقادی تولید نمی‌گردد، این مشکل ژنتیک به هنگام زایمان مشخص می‌شود. مثال دیگر، دیابت‌های وابسته به سن می‌باشد که ممکن است به ارث برسد اما در سن‌های بالاتر مشاهده می‌گردد، در این افراد، قابلیت طبیعی برای سنتز انسولین وجود ندارد. در کم خونی داسی شکل (Sickle cell anemia)، با تغییر ژنتیک

خودآموزی

در ششمین اسید آمینه (اسید گلوتامیک به والین) یک هموگلوبین جهش یافته تولید می‌شود.

ژن درمانی روش‌هایی برای تصحیح هر اختلال به وجود می‌آورد. در مورد هموفیلی، الحاق ژن فاکتور طبیعی انعقادی به سلول‌های هدف که به صورت رتروویروسی تنظیم می‌شوند، منجر به تولید فاکتور طبیعی می‌گردد. روش مشابهی نیز برای درمان کم خونی داسی شکل وجود دارد، در دیابت وابسته به سن با مساله دیگری روبرو هستیم و آن بروز بیماری در سن‌های بالاتر می‌باشد. بنابراین، درمان در مراحل ابتدایی غیر ضروری می‌باشد و هنوز مشخص نیست چه اصلاحاتی در ژن درمانی با توجه به عامل سن لازم است.

دومین عرصه برای ژن درمانی، اصلاح اثر بخشی درمانی مواد فارماکولوژیک گوناگون می‌باشد. این نکته، به خصوص برای داروهایی که نیاز به متابولیسم بیمار جهت فعالیت دارند، مهم می‌باشد. در این شرایط، ممکن است افزایش یا کاهش قدرت متابولیزه کردن در مورد دارویی خاص مفید باشد. به عنوان مثال، ۵-فلوروواوراسیل نیاز به متابولیسم آنزیمی (اوریدین فسفریلاز و اوریدین کیناز) برای تبدیل شدن به ۵-فلورودئوکسی اوریدین منوفسفات دارد که این منوفسفات به α-تیمیدیلات سنتتاز (به عنوان جایگاه عمده عمل) متصل می‌گردد. بنابراین، افزایش فعالیت آنزیم‌های متابولیزه کننده از طریق ژن درمانی باعث افزایش اثر بخشی دارو می‌گردد. در مورد کاهش قدرت متابولیزه کردن از طریق ژن درمانی می‌توان به آلوپورینول به هنگام مصرف به عنوان آنتاگونیست پورین در درمان سرطان اشاره کرد. مهار گزانتین اکسیداز از متابولیزه و تخریب شدن آلوپورینول جلوگیری به عمل می‌آورد و بنابراین، اثر بخشی دارو را افزایش می‌دهد.

سومین عرصه برای ژن درمانی مربوط به پاسخ ایمنی می‌باشد. تولید آنتی‌بادی یک نیاز مقدماتی برای مکانیسم دفاعی می‌باشد. همان گونه که درک ما از ژنتیک تولید آنتی‌بادی افزایش می‌یابد، توانایی ما برای ژن درمانی به عنوان یک استراتژی بیشتر می‌شود. پیوند مغز استخوان در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی درمان مؤثری است.برای افزایش پاسخ ایمنی اولین تلاش‌های ژن درمانی در زمینه سلول‌های گردش خون و درمان ex vivo لنفوسیت‌ها انجام گرفت.

چهارمین عرصه ژن درمانی مراقبت‌های حمایتی می‌باشد. به عنوان مثال، می‌توان از اختلال‌های نورودژنراتیو مانند بیماری آلزایمر و پارکینسون یاد کرد.

مشکلات ژن درمانی

اولین مشکل در ژن درمانی این است که تاکنون سیستم انتقالی دارو (شکل دارویی) کاملی برای ژن درمانی یافت نشده است. بهترین سیستم کشت بافت برای ترانسفکسیون سلول‌های انسانی در کشت با حامل‌های ویروسی یا غیر ویروسی می‌باشد. مطالعات به عمل آمده و در حال انجام بسیار موفقیت‌آمیز

هستند. بر عکس، توانایی ما برای درک تحقیقات مشابه (چه ex vivo و چه in vivo) بسیار ابتدایی می‌باشد. بیان این مطلب ممکن است منطقی باشد که با توجه به این پژوهش‌ها، دانش ما در این زمینه هنوز در مرحله طفولیت قرار دارد.

دومین مشکل در زمینه ژن درمانی مربوط به سلول‌های خاصی می‌باشد که جهت به دست آوردن اثربخشی درمانی باید ترانسفکته شوند. انتقال مستقیم ژن و یا بیان در سلول‌های مقتضی در بدن به طور قابل توجهی روش‌های ژن درمانی را افزایش می‌دهد. در افراد طبیعی، انسولین محصول پانکراس است و مکانیسم تفصیلی آن برای انتقال و عملکرد مشخص می‌باشد. با توجه به یافته‌های پژوهشی برای ترانسفکسیون لنفوسیت با ژن انسولین از پروتکل‌های ex vivo استفاده می‌کنند که این سلول‌ها را می‌توان به فرد باز گرداند. با این وجود، نتایج تولید انسولین توسط لنفوسیت مشخص نیست. این منبع جدید تولید انسولین چه تاثیری بر هموستاز in vivo دارد؟ وقتی انسولین با این مکانیسم تولید می‌شود، بر بدن چه اثری می‌گذارد؟

مشکل سوم در عرصه ژن درمانی، فارماکوکینتیک محصولات سنتز شده می‌باشد. هنوز مشخص نیست که بدن این محصولات را چگونه انتقال می‌دهد، فعال یا تخریب می‌کند. ممکن است مکانیسم‌های ذاتی بدن با محصولات ژنی همان گونه رفتار کند که با ملکول‌های مشابه اندوژن رفتار می‌کند. از طرف دیگر، ممکن است بر حسب سلولی که محصول ژنی را تولید می‌کند، این رفتار فرق کند.

بر اساس تعریف، ژن درمانی باید ویژگی ژنتیکی فرد را اصلاح کند. اگر این کار با سلول‌های سوماتیک انجام شود، ساختار ژنی انسانی به شکل اصلی آن باز می‌گردد. از سوی دیگر، اگر این کار با سلول‌های بنیادین (Stem cells) انجام گیرد، باعث یک تغییر همیشگی در فرد می‌شود. این فرآیند موجب تغییر اغلب ویژگی‌های فردی که باعث تمایز او شده، می‌گردد و مشکل چهارم ژن درمانی از همین جا برمی‌خیزد. به راستی چه رخ می‌دهد، اگر به هر دلیلی مجبور به قطع درمان شد؟ چگونه می‌توان این نوع درمان را قطع کرد؟ و فرد به سادگی نمی‌تواند نسخه خود را تجدید کند. آیا در ژن درمانی حتماً باید از سلولهایی با طول عمر محدود و کوتاه استفاده کرد؟ تمام این پرسش‌ها، محققان را وادار به تحقیق‌های متعدد نموده است تا بتوان در آینده‌ای نزدیک از این روش درمانی به نحو مطلوب استفاده کرد.

منابع:

1. Fielding Ak , Agar S , Russell SJ. The future of hematology , molecular biology and gene therapy. Br Med J. 1997; 314: 1346 - 1399.

2. Friedmann T. Overcoming the obstacles to gene therapy. Sci Am. 1997; 276: 96 - 101.

3. Bell J. The new genetics in clinical practice. Br Med J. 1998; 316: 618 - 620.

4. Gottlieb S. Gene therapy shows promise for haemophililia. Br Med J. 2001; 322: 1442.

5. Mathew C. Postgenomic technologies.Br Med J. 2001; 322: 1031 - 1034.

6. McCarthy A. Pharmacogenetics. Br Med J. 2001; 322: 1007 - 1008.