

YH2.14

PHÓ GIÁO SƯ, TIẾN SỸ **NGUYỄN VĂN KINH** CHỦ BIÊN

TIẾN SỸ **NGUYỄN QUỐC TUẤN**

BÁC SỸ **NGUYỄN TUẤN ANH**

THỰC HÀNH ỨNG DỤNG

G E N T R I ! L I È U



NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC



**THƯ VIỆN
HUBT**

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

PGS.TS Nguyễn Văn Kinh (Chủ biên)
TS Nguyễn Quốc Tuấn – BS Nguyễn Tuấn Anh

Thực hành ứng dụng

GEN TRI LIỆU

Nhà xuất bản Y Học 2007



LỜI GIỚI THIỆU

Ứng dụng công nghệ sinh học trong Y Học là nhiệm vụ trọng tâm của ngành Y tế hiện nay. Gen trị liệu thể hiện rõ ràng là một phương pháp chữa bệnh mới với những tính năng vượt trội, nó có thể chữa khỏi các bệnh nan y như ung thư, HIV-AIDS, viêm gan B, C mà các phương pháp truyền thống đã tỏ ra bất lực. Cuốn sách “Thực hành ứng dụng gen trị liệu” của các tác giả PGS.TS Nguyễn Văn Kinh (Chủ biên), TS. Nguyễn Quốc Tuấn, BS. Nguyễn Tuấn Anh - những người đã và đang công tác nhiều năm tại Bệnh viện Bạch Mai Hà Nội đã đề cập tới những vấn đề nóng bỏng nhất trong lĩnh vực gen trị liệu. Cuốn sách chẳng những đưa ra những luận chứng khoa học hiện đại mà còn gợi ra những ý tưởng cần được quan tâm nhằm phát triển công nghệ này trong điều kiện hoàn cảnh Việt Nam, phục vụ lợi ích cho toàn dân. Các tác giả cuốn sách cũng là những người đầy tâm huyết muốn xây dựng một cơ sở nghiên cứu ứng dụng gen trị liệu với phương châm “khoa học, dân tộc, đại chúng”. Chắc rằng ý tưởng này mau chóng trở thành hiện thực.

“Thực hành ứng dụng gen trị liệu” mang đến bạn đọc đầy đủ các thông tin khoa học cập nhật nhất. Thực chất đây là một cuốn sách Y Học Phân tử hiện đại, cung cấp cho chúng ta nhiều thông tin bổ ích mà các sách khác chưa đề cập tới. Thực hành ứng dụng gen trị liệu chắc chắn là tài liệu hữu ích cho các bác sĩ thực hành, những người làm công tác nghiên cứu thực nghiệm Y Học. Sách cũng thực sự có ích cho các sinh viên Y, Dược, các nghiên cứu sinh và tất cả những ai quan tâm tới lĩnh vực gen trị liệu.

Nhà xuất bản Y Học trân trọng giới thiệu cuốn sách “Thực hành ứng dụng gen trị liệu” tới các bạn đọc giả.

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC



LỜI NÓI ĐẦU

Những người mắc các bệnh nan y như ung thư, HIV-AIDS, u não hay viêm đa khớp dạng thấp v.v..có thể được cứu sống. Câu chuyện tưởng như viễn tưởng, nhưng nó lại là hiện thực ở thời đại ngày nay. Trong cuốn sách này chúng tôi muốn chuyển tải tới bạn đọc những thành quả mới nhất của gen trị liệu. Sách bao hàm đầy đủ thông tin về các thí nghiệm tiền lâm sàng, lâm sàng thuộc nhiều chuyên khoa từ những năm khởi đầu của gen trị liệu (1990) cho tới thời điểm cuốn sách ra đời. Phần thứ nhất của sách đề cập tới các phương pháp vận chuyển gen. Đây là vấn đề mấu chốt nhất quyết định sự thành công của gen trị liệu. Ngoài các vec tơ thông thường như retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno liên hợp, những phương thức chuyển gen khác hoàn toàn mới cũng được đề cập như liposome cationic, nhiễm sắc thể nhân tạo động vật có vú hay những vec tơ thiết kế đặc biệt để chuyển gen tới hệ thần kinh v.v.. Phần thứ hai của sách là các phương pháp điều trị cụ thể các bệnh di truyền như bệnh thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng (SCID), bệnh xơ nang, bệnh đau cơ Duchenne, các bệnh thuộc hemoglobin, các bệnh liên quan tới lysosome. Một số bệnh “nhạy cảm” được đặc biệt quan tâm cũng được đề cập như: *điều trị thâm nhiễm HIV (chương XIV), điều trị các bệnh ung thư (chương XV), điều trị các bệnh gan (chương XVI), điều trị các bệnh tim mạch (chương XVII), điều trị các bệnh thuộc hệ thần kinh (chương XVIII), điều trị bệnh u não (chương XIX), điều trị viêm đa khớp dạng thấp (chương XX).*

Sách dẫn chứng đầy đủ các thông tin cần thiết, những kết quả đã đạt được và cả những khó khăn phải đương đầu trong hiện tại và tương lai.

“Thực hành ứng dụng gen trị liệu” có thể giúp ích cho các bác sĩ lâm sàng, các nhà nghiên cứu Y, Sinh, Dược học, các nghiên cứu sinh ngành công nghệ sinh học, các sinh viên Y, Dược và nó cũng bổ ích cho bất kỳ ai muốn tìm hiểu về một bệnh nào đó mà mình quan tâm.

Để đỡ mất thời gian tra cứu của độc giả, phần cuối của sách chúng tôi có ghi chú những vấn đề liên quan tới sự chuyển và biểu hiện gen như sinh học virus, các tế bào gốc, sự chết theo chương trình của tế bào (apoptosis). Đây là những khía cạnh khoa học hiện đại mới chỉ xuất hiện trong những năm gần đây nhất nhưng lại rất cần thiết để lý giải các khía cạnh khoa học đương thời.

Điều đặc biệt lưu ý là những kết quả bước đầu trong lĩnh vực khoa học non trẻ này đã khẳng định những khả năng vượt trội của nó và rõ ràng gen trị liệu là một vũ khí tinh nhuệ nhất của Y học thế kỷ 21. Những kết quả đạt được có thể là những định hướng quan trọng cho các nhà nghiên cứu. Hy vọng những thành quả mới đạt được trong tương lai sẽ giải quyết tận gốc các vấn đề bệnh tật, nâng cao tuổi thọ của con người.

Để hoàn tất cuốn sách này chúng tôi xin trân trọng cảm ơn các nhà khoa học trong và ngoài nước đã động viên, khích lệ và cung cấp cho chúng tôi những tài liệu quý báu trong quá trình biên soạn. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn Nhà Xuất bản Y Học đã tạo điều kiện tốt nhất để cuốn sách sớm đến tay độc giả.

Vì thời gian biên soạn gấp và trình độ của các tác giả có hạn nên những sai sót trong sách là không thể tránh khỏi. Chúng tôi mong nhận được sự đóng góp từ các độc giả, các nhà khoa học và các đồng nghiệp. Một lần nữa chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

Hà Nội ngày 19 tháng 5 năm 2007

Các tác giả

MỤC LỤC

Lời giới thiệu

Lời nói đầu

Phần thứ nhất: NHỮNG PHƯƠNG TIỆN CHUYỂN GEN

Chương I. Liposome cationic

1.1 Mở đầu

1.2 Cơ chế tác động của các liposome cationic

1.3 Chuyển gen qua trung gian lipid tới biểu mô bì phân cực

1.4 Phát hiện các lipid cationic

1.5 Lipid thải chậm

1.6 Nâng cấp các plasmid

1.7 Các thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng

1.8 Vấn đề điều hòa phức hợp DNA-lipid

Chương II. Cô đặc DNA và sự vận chuyển gen qua trung gian receptor

2.1 Mở đầu

2.2 Vận chuyển gen qua từng gian receptor

2.2.1 Đích ligand

2.2.1.1 Receptor asialoglycoprotein

2.2.1.2 Receptor transferrin

2.2.1.3 Receptor Ig tổng hợp

2.2.1.4 Receptor mannose

2.2.2 Sự cô đặc và hình thành phức DNA

2.2.3 Sự lưu chuyển và tẩu thoát theo kiểu tiêu hóa nội bào

2.2.4 Xác định đích và sự chuyển vị nhân

2.3 Kết luận

Chương III. Nhiễm sắc thể động vật có vú- viễn cảnh của gen trị liệu

3.1 Mở đầu

3.2 Sự cần thiết phải kiến tạo một nhiễm sắc thể nhân tạo

3.3 Nhiễm sắc thể nhân tạo động vật có vú lý tưởng (MAC)

3.4 Các chiến lược tạo NST nhân tạo động vật có vú (ĐVCCV)

3.4.1 Cách tiếp cận từ trên xuống (top-down)

3.4.2 Cách tiếp cận từ dưới lên (bottom-up)

3.5 Các vấn đề thực tiễn tồn tại

3.6 Kết luận

Chương IV. Các vec tơ retrovirus

4.1 Mở đầu

4.2 Chu kỳ (vòng) sao chép của retrovirus

4.2.1 Những dữ kiện kinh điển

4.2.2 Sự hợp nhất của DNA virus vào trong hệ gen tế bào chủ

4.2.3 Sự sao chép, phiên dịch và lắp ráp

4.3 Phát hiện các vec tơ retrovirus

4.3.1 nguyên lý

- 4.3.2 Những bước cải tiến
- 4.4 Đích thâm nhiễm
- 4.5 Sự biểu hiện gen từ các vec tơ retrovirus
 - 4.5.1 Xem xét chung
 - 4.5.2 Đích thâm nhiễm
 - 4.5.3 Các promoter có thể cảm ứng được
- 4.6 Độ chuẩn và tính ổn định của các vec tơ retrovirus
- 4.7 Các vec tơ lentivirus
- 4.8 Viễn cảnh và kết luận

Chương V. Các vec tơ lentivirus

- 5.1 Mở đầu
- 5.2 Các cấu trúc gen của lentivirus
 - 5.2.1 Lợi thế của các vec tơ lentivirus
 - 5.2.2 Những bất lợi của các vec tơ lentivirus
- 5.3 Các vec tơ cơ sở lentivirus
 - 5.3.1 Các ảnh hưởng khác nhau đối với sự đóng gói
 - 5.3.2 Chuyển gen trực tiếp
 - 5.3.3 Virus trợ giúp trung gian
 - 5.3.4 Các hệ thống cộng nhiễm
 - 5.3.4.1 Bổ sung vỏ
 - 5.3.4.2 Sự cộng nhiễm khi sử dụng vec tơ độc lập và các cấu trúc đóng gói
 - 5.3.4.3 Cộng nhiễm với 3 plasmid
 - 5.3.5 Các đơn vị tế bào đóng gói
 - 5.3.5.1 Các vấn đề protein
 - 5.3.5.2 Các cấu trúc có thể cảm ứng được
- 5.3.6 Sự giả vỏ
- 5.3.7 Sự chuyển giao protein
- 5.3.8 Độ chuẩn virus
- 5.4 Phạm vi ứng dụng
- 5.5 Độ an toàn

Chương VI. Các vectơ adenovirus

- 6.1 Mở đầu
- 6.2 Cấu trúc và tổ chức của adenovirus
- 6.3 Thiết kế và cấu trúc vec tơ adenovirus
- 6.4 Sự nhân giống và làm tinh khiết các vec tơ adenovirus
- 6.5 Chuyển gen *in vivo* qua trung gian adenovirus
- 6.6 Đánh lừa đáp ứng miễn dịch của vật chủ đối với sự chuyển gen adenovirus *in vivo*.

Chương VII. Các vec tơ adenovirus liên hợp (AAV)

- 7.1 Mở đầu
- 7.2 Tính chất sinh học của AAV
 - 7.2.1 Phân loại và lịch sử tự nhiên của AAV
 - 7.2.2. Cấu trúc AAV và hệ gen của nó
 - 7.2.3 Chu kỳ sống của AAV

- 7.2.4 Tính đặc hiệu vị trí của sự hợp nhất AAV
- 7.3 Các vec tơ tái tổ hợp từ AAV
 - 7.3.1 Cấu trúc của các vec tơ AAV tái tổ hợp
 - 7.3.2 Chiến lược đóng gói các vec tơ AAV TÁI TỔ HỢP
 - 7.3.3 Sự tồn tại của DNA vectơ trong các tế bào đích
 - 7.3.4 Các yếu tố của tế bào vật chủ tác động tới sự tải nạp vec tơ AAV
 - 7.3.5 Tóm tắt những tiện lợi và bất tiện của các vec tơ tải nạp AAV
- 7.4 Ứng dụng của vec tơ AAV
 - 7.4.1 Ứng dụng *in vitro*
 - 7.4.2 Ứng dụng *in vivo*
- 7.5 Vấn đề an toàn
 - 7.5.1 Những vấn đề liên quan tới tính an toàn
 - 7.5.2 Vấn đề an toàn môi trường

Chương VIII. Những tiến bộ đạt được trong các vec tơ HSV công nghệ hóa dùng để chuyển gen tới hệ thần kinh

- 8.1 Mở đầu
- 8.2 Đặc điểm sinh học của HSV
- 8.3 Phát triển các vec tơ HSV cho hệ thần kinh
 - 8.3.1 Loại trừ các chức năng phụ để nâng cao khả năng của gen ngoại lai
 - 8.3.2 Độc tính tế bào của các vec tơ hợp nhất
 - 8.3.3 Hệ thống promoter đối với sự biểu hiện gen chuyển
 - 8.3.3.1 Sự biểu hiện tức thì
 - 8.3.3.2 Sự biểu hiện dài hạn
 - 8.3.3.3 Điều hòa sự biểu hiện gen chuyển
 - 8.3.4 HSV amplicon
 - 8.3.5 Các vec tơ lai HSV-AAV mới
- 8.4 Tóm tắt chung và triển vọng của các vec tơ dùng trong hệ thần kinh

Phần thứ hai: GEN TRỊ LIỆU LÂM SÀNG

Chương IX. Gen trị liệu bệnh thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng (SCID)

- 9.1 Mở đầu
- 9.2 Bệnh lý phân tử của SCID
 - 9.2.1 Thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng liên quan tới NST giới tính
 - 9.2.2 Khiếm khuyết JAK-3
 - 9.2.3 Thiếu hụt adenosine desaminase và purine nucleoside phosphorylase
 - 9.2.4 Khiếm khuyết gen hoạt hóa tái tổ hợp (RAG1 và RAG2)
 - 9.2.5 Khiếm khuyết ZAP 70
 - 9.2.6 Thiếu hụt MHC lớp I (hội chứng lympho trần type I)
 - 9.2.7 Thiếu hụt miễn dịch MHC lớp II (hội chứng lympho trần type II)
 - 9.2.8 Những bất thường TCR-CD3
- 9.3 Gen trị liệu soma đối với bệnh thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng trong SCID
 - 9.3.1 Gen trị liệu lâm sàng đối với ADA-SCID
 - 9.3.2 Gen trị liệu lympho T đặp với ADA-SCID

9.4 Cải tiến các hệ thống vec tơ

9.5 Đánh giá tiền lâm sàng sự chuyển gen tế bào gốc của sự tạo máu

Chương X. Điều trị bệnh xơ nang

10.1 Mở đầu

10.2 Đặc trưng di truyền của bệnh xơ nang

10.3 Protein CFTR và bệnh học của bệnh xơ nang (CF)

10.4 Điều trị bệnh xơ nang

10.5 Hệ thống chuyển gen và bệnh xơ nang

10.5.1 Cơ sở lý luận

10.5.2 Chuyển gen qua trung gian retrovirus

10.5.3 Chuyển gen qua trung gian adenovirus

10.5.4 Chuyển gen qua trung gian virus adeno liên hợp

10.5.5 Chuyển gen qua trung gian lipid cationic

10.6 Kết luận

Chương XI. Điều trị các bệnh thuộc hemoglobin

11.1 Mở đầu

11.2 Vec tơ retrovirus cho globin

11.3 các vec tơ virus adeno liên hợp

11.4 Tái tổ hợp tương đồng và sự sửa chữa

11.5 Trị liệu gen gián tiếp bệnh thiếu máu vùng biển □

11.5.1 Hiệu ứng ghép nối bất thường

11.5.2 Hoạt hóa các gen bù

11.5.3 Chuyển gen tạo hồng cầu

11.5.4 Giảm biểu hiện gen □ globin

11.5.5 Các kiểu GTL khác

11.6 Điều trị bệnh tế bào liềm

11.7 Viễn cảnh tương lai

Chương XII. Điều trị bệnh đau cơ Ducchenne

12.1 Mở đầu

12.2 Các đặc trưng bệnh lý và lâm sàng

12.3 Gen dystrophin và các sản phẩm của nó

12.4 Sự định vị và chức năng của dystrophin

12.5 Các hệ thống mô hình của bệnh đau cơ Ducchenne (DMD)

12.6 Những cách tiếp cận đối với việc điều trị bệnh DMD

12.7 Điều trị bệnh DMD: Ghép nguyên bào cơ

12.8 Gen trị liệu bệnh DMD

12.8.1 Tiêm trực tiếp DNA

12.8.2 Các vec tơ retrovirus

12.8.3 Các vec tơ adenovirus

12.9 hay đổi các chiến lược trị liệu

12.10 Kết luận

Chương XIII. Điều trị những bệnh liên quan tới lysosome

- 13.1 Mở đầu
- 13.2 Xác định quần thể bệnh nhân
- 13.3 Điều trị chuẩn và điều trị “thực nghiệm”
 - 13.3.1 Chăm sóc chu đáo
 - 13.3.2 Thay thế enzyme
 - 13.3.3 Ghép tủy xương
- 13.4 Các mô đích của GTL
 - 13.4.1 Ghép các tổ chức mới
 - 13.4.2 Thao tác với các tế bào lympho
 - 13.4.3 Ghép tủy xương tự thân
 - 13.4.4 Đích trực tiếp của hệ TKTƯ
- 13.5 Kết luận

Chương XIV. Điều trị thâm nhiễm HIV

- 14.1 Mở đầu
- 14.2 Tổ chức gen HIV
- 14.3 Chu kỳ sống (vòng đời) và bệnh lý học của thâm nhiễm HIV
- 14.4 Những cách tiếp cận nhằm ức chế sự sao chép của HIV
 - 14.4.1 Những protein không trans trở
 - 14.4.2 Các kháng thể chuỗi đơn
 - 14.4.3 Các protein tế bào nội sinh và các tác nhân kháng HIV
- 14.5 Các cách tiếp cận GTL vopứ cơ sở acid nucleic
 - 14.5.1 Bẫy RNA
 - 14.5.2 Antisense DNA và RNA
 - 14.5.3 ribozyme (antisense RNA xúc tác)
- 14.6 Các cách tiếp cận nhằm kích thích đáp ứng miễn dịch đặc hiệu HIV
 - 14.6.1 Các vaccine DNA
 - 14.6.2 Các lympho T gây độc tế bào đặc hiệu HIV
- 14.7 Các khía cạnh thực tiễn của gen trị liệu HIV
 - 14.7.1 Các đích tế bào của GTL
 - 14.7.2 các hệ thống chuyển gen
 - 14.7.3 Các thử nghiệm lâm sàng GTL kháng HIV
 - 14.7.3.1 Đánh dấu các tế bào T đồng gen
 - 14.7.3.2 Đánh dấu các tế bào T độc tế bào
 - 14.7.3.3 Rev trans trở
 - 14.7.3.4 Rev trans trở trong sự tổ hợp với antisense TAR
 - 14.7.3.5 Các ribozyme kháng HIV
 - 14.7.3.6 Vaccinne gen
 - 14.7.3.7 Các kháng thể nội bào
- 14.8 Kết luận

Chương XV. Điều trị các bệnh ung thư

- 15.1 Mở đầu
- 15.2 Cơ sở di truyền của gây ung thư
 - 15.2.1 Chu kỳ tế bào
 - 15.2.2 Sự chết theo chương trình của tế bào –apoptosis

- 15.2.3 Sự biến nạp tế bào
- 15.2.4 Các gen gây ung thư
- 15.2.5 Các gen kiểm chế ung thư
- 12.5.6 Các gen sử chữa DNA
- 15.3 Gen trị liệu ung thư
- 15.3.1 Tăng cường kiểm chế ung thư
- 15.3.1.1 Retrovirus
- 15.3.1.2 Adenovirus và virus adeno liên hợp
- 15.3.1.3 Các hệ thống chuyển gen không phải là virus
- 15.3.2 Làm bất hoạt biểu hiện quá mức các gen ung thư
- 15.3.3 Trị liệu với tiền thuốc đích (targeted prodrug)
- 15.3.4 Cải biến đáp ứng miễn dịch kháng u
- 15.3.4.1 Miễn dịch khối u qua trung gian tế bào
- 15.3.4.2 Các cytokine
- 15.3.4.3 Sự kiểm chế miễn dịch
- 15.4 Các vaccine kháng ung thư DNA
- 15.4.1 Các vaccine cơ sở vec tơ
- 15.4.2 Tiêm chủng vaccine cơ sở tế bào
- 15.4.2.1 Các vaccine khối u cải biến gen
- 15.4.2.2 Tiêm chủng với các tế bào phân nhánh (dendritic)
- 15.4.3 các vaccine cơ sở idioype
- 15.5 Tóm lại

Chương XVI. Điều trị các bệnh gan

- 16.1 Mở đầu
- 16.2 Nguyên lý chung của GTL với gan
- 16.3 Các vec tơ virus
- 16.3.1 Retrovirus
- 16.3.2 Adenovirus
- 16.3.3 Virus adeno liên hợp
- 16.3.4 Các vec tơ không virus
- 16.3.4.1 Liposome
- 16.3.4.2 Các phức hợp protein-DNA
- 16.4 Những ứng dụng lâm sàng của GTL trực tiếp bệnh cholesterol cao có tính chất gia đình
- 16.4.1 Bệnh tăng cholesterol có tính chất gia đình
- 16.4.2 Bệnh ưa chảy máu hemophilia B
- 16.4.3 Bệnh thiếu hụt α_1 -antitrypsin
- 16.4.4 Hội chứng Crigler-Najjar
- 16.5 Gen trị liệu với thâm nhiễm virus
- 16.5.1 Bệnh viêm gan virus mạn
- 16.5.2 Virus gây viêm gan B
- 16.5.3 Virus gây viêm gan C
- 16.6 Ung thư tế bào gan
- 16.7 Bệnh gan do alcohol

Chương XVII. Điều trị các bệnh tim mạch

- 17.1 Mở đầu
- 17.2 Thao tác gen đối với mô tim mạch
 - 17.2.1 Sự điều biến biểu hiện gen trong các mô tim mạch
 - 17.2.2 Vec tơ chuyển giao DNA tim mạch
 - 17.2.2.1 Plasmid
 - 17.2.2.2 Các vec tơ retrovirus không sao chép tái tổ hợp
 - 17.2.2.3 Adenovirus tái tổ hợp
 - 17.2.2.4 Virus adeno liên hợp (AAV)
 - 17.2.3 Kiểm soát sự biểu hiện gen trong mô tim mạch
- 17.3 Gen trị liệu hẹp van tim tái phát
 - 17.3.1 Sinh lý bệnh học của hẹp van tim tái phát
 - 17.3.2 Các cách tiếp cận để kiểm chế tế bào và gây độc tế bào
- 17.4 Gen trị liệu sự tạo mạch
 - 17.4.1 Sự tạo mạch và các yếu tố của sự tạo mạch
 - 17.4.2 Gen trị liệu sự tạo mạch
- 17.5 Gen trị liệu sự ghép mạch
 - 17.5.1 những cải biến sinh học đối với ghép tĩnh mạch
 - 17.5.2 Công nghệ sinh học và gen trị liệu
- 17.6 Gen trị liệu các bệnh tim
 - 17.6.1 Suy tim xung huyết
 - 17.6.2 nhồi máu cơ tim
 - 17.6.3 Thiếu máu cục bộ và sự tưới nước (tái truyền dịch)
- 17.7 Tóm lại

Chương XVIII. Điều trị các bệnh thuộc hệ thần kinh

- 18.1 Mở đầu
- 18.2 Sự phức tạp của hệ thần kinh
- 18.3 Những lệch lạc trong hệ thần kinh
- 18.4 Các yếu tố dinh dưỡng thần kinh và gen trị liệu
 - 18.4.1 Các yếu tố dinh dưỡng thần kinh
 - 18.4.2 Các mô hình động vật GTL về sự thoái hóa thần kinh
 - 18.4.3 Khai thác các đặc tính của HIV trong việc chuyển gen trong hệ thần kinh
 - 18.4.4 Sự chết theo chương trình của các tế bào và sự thoái hóa thần kinh
- 18.5 Cấy ghép neuron và các tế bào gốc
 - 18.5.1 Từ cấy ghép thực nghiệm tới các ứng dụng trong lâm sàng
 - 18.5.2 Các tế bào gốc ở não người trưởng thành
 - 18.5.3 Chuyển gen ung thư tới các tế bào thần kinh
- 18.6 Các bệnh thopái hóa thần kinh trên lâm sàng
 - 18.6.1 Bệnh Alzheimer
 - 18.6.2 Bệnh Parkinson
 - 18.6.3 Bệnh Huntington
 - 18.6.4 Bệnh xơ cứng cột bên teo cơ
 - 18.6.5 Bệnh đa xơ cứng
- 18.7 Các thử nghiệm lâm sàng test các tế bào biến đổi gen và các yếu tố dinh dưỡng thần kinh đối với thoái hóa thần kinh

18.8 Những vấn đề cần quan tâm trong tương lai

Chương XIX. Điều trị bệnh u não

19.1 Mở đầu

19.2 Nhân tố cơ bản của các thí nghiệm trị liệu gen với u não

19.3 Các thử nghiệm GTL đã được phê chuẩn với việc sử dụng gen HSV-TK đối với các u não

19.3.1 Gen nhạy cảm HSV-TK

19.3.2 Khảo sát các phương pháp chuyển gen cho các khối u ở thần kinh trung ương

19.3.3 Chuyển gen nhạy cảm HSV-TK qua trung gian retrovirus *in vivo*

19.3.4 Chuyển gen nhạy cảm HSV-TK *in vivo* qua trung gian adenovirus

19.3.5 Tải nạp *ex vivo* gen IL-2 và IL-4 của người vào trong nguyên bào cơ hoặc trong các khối u với các vec tơ retrovirus

19.3.6 Chuyển gen antisense IGF-1 *ex vivo* với một vec tơ plasmid vào các tế bào khối u bản thân

19.3.7 Chuyển gen antisense TGF- β *ex vivo* vào trong các tế bào khối u

19.3.8 Chuyển gen MDR-1 *ex vivo* vào trong các tế bào gốc tạo máu với các vec tơ rétrovirus chuột

19.4 Tóm lại

Chương XX. Điều trị viêm đa khớp dạng thấp

20.1 Mở đầu

20.2 Những vấn đề cần xem xét về GTL trong viêm đa khớp dạng thấp

20.3 Bệnh lý học của viêm đa khớp dạng thấp

20.4 Chuyển gen tới các tế bào hoạt dịch

20.5 Các mô hình động vật dùng để test gen trị liệu

20.6 Những đích hiện nay của gen trị liệu viêm đa khớp dạng thấp

20.7 Hiện trạng lâm sàng và triển vọng của viêm đa khớp dạng thấp

PHỤ LỤC

Phụ lục I. Một số khía cạnh sinh học virus liên quan tới sự chuyển gen

1.1 Hệ gen của virus

1.2 Virus chỉ thâm nhiễm những tế bào xác định

1.3 Sự nhận diện tế bào vật chủ của thực khuẩn thể

1.4 Các thực khuẩn thể đưa acid nucleic của chúng vào các tế bào vật chủ

1.5 Sự nhận diện tế bào vật chủ của những virus động vật

1.5.1 Sự gắn kết qua các virus trần

1.5.2 Sự gắn kết qua các virus có vỏ

1.6 Các virus động vật vào trong các tế bào vật chủ và sự lột vỏ acid nucleic của chúng

Phụ lục II. Những khái niệm cơ bản về tế bào gốc và những ứng dụng của chúng trong gen trị liệu

- 2.1 Mở đầu
- 2.2 Thế nào là tế bào gốc và tầm quan trọng của chúng như thế nào?
- 2.3 Những đặc tính độc quyền của tất cả các tế bào gốc
 - 2.3.1 Các tế bào gốc không chuyên hóa
 - 2.3.2 Các tế bào gốc có khả năng phân chia và tự phục hồi dài hạn
 - 2.3.3 Các tế bào gốc có thể sản sinh ra các tế bào chuyên hóa
- 2.4 Các tế bào gốc của phôi
 - 2.4.1 Các giai đoạn phát triển sớm giữ vai trò quan trọng trong việc sản sinh các tế bào gốc
 - 2.4.2 Phát triển các tế bào gốc của phôi trong phòng thí nghiệm
 - 2.4.3 những test trong phòng thí nghiệm để xác định các tế bào gốc của phôi
 - 2.4.4 Kích thích sự biệt hóa các tế bào gốc của phôi
- 2.5 Các tế bào gốc trưởng thành
 - 2.5.1 Nơi cư trú của các tế bào gốc trưởng thành và những nhiệm vụ của chúng
 - 2.5.2 Các test cần dùng để xác định các tế bào gốc trưởng thành
 - 2.5.3 Những điều đã biết về sự biệt hóa tế bào gốc trưởng thành
 - 2.5.3.1 Những cách biệt hóa bình thường của các tế bào gốc trưởng thành
 - 2.5.3.2 Tính mềm dẻo hay sự chuyển biệt hóa của các tế bào gốc trưởng thành
 - 2.5.4 Một số câu hỏi chủ chốt về các tế bào gốc trưởng thành
- 2.6 Những điểm giống nhau và khác nhau giữa các tế bào gốc của phôi và tế bào gốc trưởng thành
- 2.7 Tiềm năng của việc sử dụng các tế bào gốc người và những trở ngại cần phải vượt qua trước khi tiềm năng này trở thành hiện thực

Phụ lục III. Sự chết theo chương trình của tế bào

- 3.1 Chức năng cơ bản của apoptosis
 - 3.1.1 Sự cân bằng nội mô
 - 3.1.2 Sự phát triển và biệt hóa
 - 3.1.3 Chức năng miễn dịch
 - 3.1.4 Sự tiêu hủy tế bào
- 3.2 Apoptosis ở giun tròn *Caenorhabditis elegans*
- 3.3 Các thành phần của chương trình apoptosis ở động vật có xương sống
 - 3.3.1 Caspase: sự chết do ly giải protein
 - 3.3.2 Họ protein Bcl-2
 - 3.3.3 Các đồng yếu tố của sự hoạt hóa caspase
 - 3.3.4 Điều hòa nội bào
- 3.4 Apoptosis qua trung gian stress: con đường cytochrome c/Apaf1
- 3.5 Apoptosis phát sinh bởi receptor chế
- 3.6 Apoptosis và con đường tín hiệu tế bào

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

Phần Th ứ nhất

NHỮNG PHƯƠNG TIỆN CHUYỂN GEN

Chương I

LIPOSOME CATIONIC

1.1 Mở đầu

Liposome cationic là các vec tơ tổng hợp làm trung gian cho việc chuyển giao và biểu hiện các gen chuyển (transgene) bên trong các tế bào động vật. Vec tơ này ra đời nhờ những tiến bộ đáng kể đã đạt được trong một số lĩnh vực khoa học. Một điều đã được xác nhận là những cơ chế tác động của thuốc thử đã được hiểu rõ hơn và người ta đã hoàn thiện được phân tử lipid ứng dụng trong việc vận chuyển các gen đặc hiệu *in vivo*. Tuy nhiên, trong chiến lược này có sự linh hoạt trong việc tiếp cận mới nhằm cải tiến các kỹ thuật điều trị bệnh cho con người. Phức hợp DNA-lipid đã được ứng dụng trong lâm sàng và tiền lâm sàng. Với các kết quả ban đầu đã tạo nên vô số các mô hình có thể ứng dụng được trên người.

1.2 Cơ chế tác động của các liposome-cationic

Felgner và cộng sự là những người đầu tiên sử dụng các phân tử lipid có nhóm tích điện dương ở đầu để chuyển gen vào các tế bào nuôi cấy. Một phân tử lipid trung tính chẳng hạn như dioleoyl phosphatidyl ethanolamin (DOPE) đã tạo hiệu quả cho sự chuyển gen. Về mặt hiệu quả, phương pháp này có thể so sánh được với hầu hết các phương pháp chuyển gen khác không phải là virus *in vitro* và đã thể hiện có hiệu quả với hầu hết các tế bào đã được nghiên cứu. Về cơ chế của quá trình cũng như các đặc tính làm giới hạn sự chuyển gen trung qua lipid thì vẫn chưa rõ hoàn toàn. Không giống như các hệ thống chuyển giao thuốc dựa trên cơ sở lipid khác, DNA plasmid không được đóng gói trong lõi của liposome hình cầu, thay vì là DNA cô đặc hơn do các lipid cationic đã phủ lên toàn bộ hoặc một phần plasmid. Dạng bọc áo và cô đặc này của DNA có thể xác định được bằng hiển vi điện tử hoặc đo bằng tính khó nóng chảy của DNA khi xử lý với nuclease *in vitro*. Mặc dù lúc đầu người ta nghĩ rằng phức hợp DNA-lipid thẩm trực tiếp vào màng sinh chất rồi đi vào tế bào chất. Nhưng hiện nay người ta lại cho rằng trong nhiều trường hợp sự tiếp nhận DNA plasmid phải đòi hỏi quá trình tiêu hòa nội bào (endocytosis) và có thể được tăng cường bởi các thuốc nội thẩm thấu (endosomolytic) như chloroquine hoặc thêm vào các virus (adenovirus) có khả năng nội thẩm thấu trung gian. Những cố gắng nhằm nâng cao hiệu lực sự vận chuyển gen qua trung gian lipid *in vitro* cũng tập trung vào việc phát triển các mẫu thuốc thử (reagent) lipid mới nhằm tăng sự gắn kết với màng tế bào. Hiệu quả của việc chuyển một dạng tế bào đặc biệt vào trong môi trường nuôi cấy thường đòi hỏi một tỷ lệ thích hợp lipid:DNA hoặc tỷ lệ của các cationic để trung hòa lipid. Tuy nhiên, vẫn chưa tìm được một hợp chất có hiệu lực để chuyển plasmid vào tế bào chất. Đó là một khía cạnh quan trọng làm hạn chế toàn bộ quá trình. Sự chuyển giao với hiệu lực cao của các phân tử plasmid huỳnh quang hoặc nucleotide huỳnh quang đã được thực hiện ở một vài dạng tế bào và đã chuyển giao gần như 100% DNA vào trong các tế bào nuôi cấy. Việc giải phóng bào chất DNA khỏi liposome là một đặc trưng quan trọng về tính hiệu quả của toàn bộ quá trình. Hiệu lực ẩn tượng của sự chuyển giao DNA plasmid tới các tế bào nuôi cấy không phân cực là tương đối thấp. Thậm chí, dưới các điều kiện thích hợp nhất cũng chỉ phát hiện có 1-5% các tế bào đã được chuyển với nhiều dạng

khác nhau, như trường hợp chuyển gen β -galactosidase (nếu được xét đoán bằng một thử nghiệm tương đối nhạy chẳng hạn như hóa tế bào X-gal). Những trái ngược này dẫn đến giả thuyết cho rằng việc giải phóng các phân tử plasmid khỏi lipid cationic và việc plasmid vào nhân đã làm trở ngại thật sự cho sự biểu hiện gen khi có mặt liposome cationic. Điều đó cũng có thể nghĩ rằng việc chuyển gen cơ sở plasmid đòi hỏi phải vào lúc có sự phân chia tế bào và sự hòa tan đồng thời của màng nhân. Và trong nuôi cấy tế bào thì chỉ có một phần nhỏ tế bào có sự phân bào nguyên nhiễm tích cực vào đúng thời điểm có chuyển giao plasmid, tức là có khả năng chuyển chở các plasmid từ tế bào chất tới nhân để thực hiện sự phiên mã. Người ta đã thử nghiệm các phân tử plasmid được gắn các tín hiệu định vị nhân qua các lỗ nhân (một cải tiến hiện đại nhất làm tăng hiệu lực chuyển gen ở các tế bào không phân cực *in vitro*). Tuy nhiên, vai trò của màng nhân trong sự chuyển gen qua trung gian lipid quả là phức tạp vì khi kéo dài sự tiếp cận tế bào với phức hợp DNA-lipid (để cho phép một lượng lớn tế bào qua giai đoạn phân chia trong khi chuyển plasmid tới tế bào chất) thì chưa chắc đã làm tăng được hiệu ứng chuyển gen hoặc biểu hiện gen. Hơn nữa, thử nghiệm chuyển các tế bào đồng bộ lại không làm tăng hiệu lực vận chuyển. Khi dùng các phương pháp nhạy để xác định sự biểu hiện gen thì thấy hầu hết các tế bào trong quần thể lại tiếp nhận và biểu hiện gen ngoại lai. Nhưng cũng có một số tế bào xác định trong quần thể lại được chuyển gen ở mức cao, lý do của sự biểu hiện cao này vẫn chưa được rõ.

1.3 Chuyển gen qua trung gian lipid tới biểu mô bì phân cực

Khả năng chuyển các liposome cationic tới các tế bào biểu mô bì đã phân hóa là tương đối yếu đã gợi ý rằng sự phân cực và hình thành các ghép nối vững chắc đã làm giới hạn sự chuyển giao các phân tử DNA plasmid. Sự tăng trưởng của các tế bào biểu mô bì *in vitro* thường được dùng để mô hình hóa *in vivo* ở phổi, ruột hoặc các biểu mô khác. Dưới các điều kiện này, sự tiếp nhận và chuyển giao DNA là rất hạn chế và khối plasmid đã vào trong tế bào chất sau này có thể sẽ can thiệp vào hiệu lực chuyển gen. Các chất thẩm trung gian như sodium glycolate có thể làm tăng sự tải nạp gen (gene transduction) của phổi chuột, nhưng những tác nhân này cũng làm tăng độc tính. Ít nhất đã có một mô hình chỉ rõ có sự phụ thuộc rất nhiều vào tiêu hóa nội bào (endocytosis) ở các tế bào đã phân hóa và phân cực. Tuy nhiên có thể thu được kết quả nếu sử dụng một liều rất cao phức hợp DNA-lipid *in vivo*, cơ sở lý luận của vấn đề này vẫn chưa được rõ. Tuy nhiên, việc tạo ra các lipid thế hệ mới hơn có thể sẽ nâng cao được khả năng vận chuyển tới các lớp đơn của biểu bì. Những kết quả này vạch ra một điểm quan trọng là phải lựa chọn cẩn thận các mô hình thích hợp để kiểm tra hiệu lực của lipid cationic *in vitro*, hoặc phải dự đoán trước các hiệu ứng sinh học *in vivo*. Với biểu mô bì đã phân hóa (trong các mô như phổi, đường tiêu hóa hoặc trong các khối u đặc) đòi hỏi phải có sự xem xét đặc biệt vì nó có thể là một đích hiệu quả cho sự chuyển gen qua trung gian lipid *in vivo*.

1.4 Phát hiện các lipid cationic

Việc phát hiện các lipid cationic tân tiến cho sự chuyển gen phụ thuộc vào các test thực nghiệm của phòng thí nghiệm về các hợp chất mà mỗi hợp chất lại được sàng lọc cho các ứng dụng đặc biệt. Nhìn chung lợi thế cuối cùng thuộc về lipid trung tính có công thức là DOPE. Các hợp chất thuộc thế hệ đầu tiên như DOTMA và DOTAP đã chưa vượt bỏ được

các lipid có chứa các nhóm có tiếp đầu là polyamin. Dưới các điều kiện đặc biệt, các chất mới hơn rõ ràng đã làm tăng hiệu lực chuyển giao. Tuy nhiên, công thức tối ưu đặc hiệu vẫn chỉ cho từng dạng tế bào, tức là phải có rất nhiều công thức liposome cationic.

Để áp dụng *in vivo* phải sàng lọc một lượng lớn các vec tơ liposome để xác định được một hợp chất có hoạt tính cao. DMRIE (1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethylamminium bromide) được xác định là một hợp chất chuyển hiệu quả và các gen trị liệu đã được thiết lập ở các khối u đặc trong các thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng. GAPDLRIE cũng được chứng minh là có tiềm năng trong các nghiên cứu *in vivo*, chẳng hạn như trong việc chuyển và biểu hiện gen trong các tế bào nội mạc mạch (intimal) và các tế bào giữa (medial) động mạch lớn. Một số lipid (gồm DOTMA và các hợp chất thuộc thế hệ sau nữa) đã được công thức hóa đặc biệt cho chuyển giao trong các tĩnh mạch, điều đó đã gọi ra các tín hiệu gen với các mô như phổi và gan. Trong các mô hình thiết kế thì các tế bào Kuffer của hệ thống lưới nội mô ở gan được chú ý hơn cả. Người ta đã xác định được các liposome có công thức đặc biệt phù hợp với việc chuyển gen tới phổi của chuột. Ví dụ như GL-67 là một phức hợp khí dung DNA plasmid dùng để chuyển gen tới phổi chuột hiệu quả cao hơn gần 1000 lần DNA đơn và 100 lần so với các đối tượng khác. Như vậy, lipid tối ưu hóa đã được dùng để chuyển gen tới phổi. Mặc dù vậy, lớp hợp chất này vẫn phải được xác định qua sự sàng lọc chặt chẽ của các phòng thí nghiệm lớn về liposome cationic và người ta đã bắt đầu phân tích hoạt tính – cấu trúc của chúng. Các nghiên cứu về các chất tương tự lớp này như GL-67 thì nhóm cationic đầu hình chữ T có phần mở neo của cholesterol gắn với spermine đã làm tăng đáng kể khả năng chuyển gen tới phổi chuột *in vivo*. Việc cải biến các vùng đặc biệt trong phân tử GL-67 cho phép nâng cao hơn nữa khả năng hoạt động của thuốc khi sử dụng các phương pháp y hóa học truyền thống. Các lipid cationic guanidium – cholesterol cũng đã được thông báo là các chất chuyển gen trung gian hiệu lực tới phổi động vật. Tuy nhiên, một lipid đặc hiệu lại chỉ có hoạt tính ở các mô đặc hiệu (tức GL-67 chỉ dùng cho phổi và không có tiềm năng cao đối với các mô khác). Điều đó chỉ ra rằng việc phát triển các liposome cationic dùng cho *in vivo* đòi hỏi phải có sự sàng lọc rất kỹ và phải có các test thực nghiệm cho từng trường hợp cụ thể.

1.5 Lipid thái chậm

Thất bại của việc gắn phức hợp DNA-lipid với các tế bào đích rồi việc plasmid kém hoặc không hiệu lực đi vào tế bào chất là một vấn đề quan trọng làm giới hạn sự chuyển gen qua trung gian lipid *in vivo*. Việc cải tiến các phức hợp liposome bằng cách hợp nhất với protein virus Sendai đã được ứng dụng trong chuyển gen *in vitro* và *in vivo* trong một số trường hợp như biểu hiện insulin tái tổ hợp để điều chỉnh hạ thấp mức glucose huyết ở chuột, hay chuyển phân tử antisense oligonucleotide để ngăn chặn sự nhân lên của tân nội mạc (neointimal) hoặc chuyển gen tới võng mạc động vật hay tới các khối u não. Enzyme chuyển đổi angiotensin của người (human angiotensin converting enzyme –ACE) cũng được chuyển bằng phương pháp này vào trong động mạch cảnh chuột để ACE được biểu hiện cả trong tế bào cơ trơn giữa (medial smooth muscle) và trong các tế bào biểu mô nội mạc mạch. Những thay đổi tăng sinh mạch máu cũng quan sát thấy ở các động mạch, mô hình biểu hiện trong thành động mạch thỏ cũng đã được công bố. Cách tiếp cận tương tự cũng thấy trong chuyển gen superoxyde dismutase với tỷ lệ % rất cao các tế bào cơ tim trong mô hình ghép tim trên chuột. Đích của các lipid cationic tới các receptor

đặc hiệu theo con đường nội bào (endocytic) cũng đã được thông báo. Chẳng hạn như trong thử nghiệm nhằm tránh sự bất hoạt của lipid cationic trong tuần hoàn thì DNA sẽ được phức hợp với lipopolyamin hoặc các ligand khác. Mẫu hình này cũng được sử dụng đối với receptor asialoglycoprotein và cũng đã áp dụng mô hình theo cơ chế này *in vitro*. Lipid cationic có thể được làm ổn định khi chuyển gen *in vivo* bằng cách gắn với các polyamin hay polyethylen glycol phospholipid. Tương tự như vậy, các thí nghiệm gắn lipid cationic vào các virus tổng hợp nhân tạo cũng đã được dự định cho các vec tơ không phải virus.

1.6 Nâng cấp các plasmid

Hai vấn đề chính cần đặt ra trong việc nâng cao chất lượng của sự chuyển gen là do: (1) mức độ biểu hiện còn thấp và (2) thời gian biểu hiện ngắn. Một vài chiến lược đã được thử nghiệm *in vitro* hướng vào các vấn đề này. Các trình tự đích của nhân liên kết đồng hóa trị với plasmid đã làm tăng đôi chút hoạt tính gen. Cũng tương tự như vậy, T7 polymerase cũng làm tăng khả năng biểu hiện gen *in vitro* mặc dầu thời gian tồn tại của plasmid vẫn chưa kéo dài đáng kể. Sự lựa chọn một cách khôn khéo các yếu tố điều hòa gen có thể làm tăng thật sự hiệu quả chuyển gen như với liposome cationic chẳng hạn. Để chuyển gen vào phổi *in vivo* người ta đã cải tiến một promoter trên cơ sở cytomegalovirus (CMV). Theo như thông báo, mức độ biểu hiện gen cao hơn 100 lần các cấu trúc thể hệ thứ nhất theo cùng một thiết kế. Vùng phía 5' của *c-erb* B-2 được sử dụng để hướng dẫn đặc hiệu cho gen thymidin kinase của virus herpes simplex (HSV-tk) vào trong các khối u mới phát triển ở chuột. Các plasmid cơ sở các trình tự virus Epstein-Barr được chuyển tới gan bằng các liposome cationic có thể tồn tại vài tháng, rõ ràng là do sự định hướng của plasmid có thể tự sao chép được của episome. Các plasmid có thể tự sao chép lâu dài trong các tế bào biểu mô do có sự hợp nhất virus gây u nhú trên người (human papilloma virus –HPV) E1, E2 và vùng điều hòa trên (upstream). Các yếu tố HPV này là các chất hoạt hóa vận chuyển mạnh, nó làm tăng 10.000 lần tín hiệu gen ở các tế bào biểu mô trong môi trường nuôi cấy.

1.7 Các thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng

Một vài công trình nghiên cứu trên người với việc sử dụng liposome cationic đã cho những kết quả khích lệ sau khi đưa plasmid DNA vào mũi để điều hòa độ dẫn điện vận chuyển màng tế bào bệnh xơ nang (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator – CFTR). Các thử nghiệm nhằm: (1) theo dõi sự phân phối luồng khí của phức hợp DNA-lipid khí dung và (2) tái phân phối và theo dõi luồng khí qua mũi với DNA-lipid. Cả hai công việc đó đều đã hoàn tất. Nói chung, những nghiên cứu này đã chỉ ra rằng các chỉ số đo được về sự vận chuyển gen cho thấy với quy trình qua mũi có ít tác dụng phụ nhất và khí dung cũng gây độc cho hệ thống. Những tiến bộ đạt được trong kỹ thuật liposome dẫn đến việc phát triển các test lâm sàng với nhiều ứng dụng khác nhau của gen trị liệu trên người. Việc chuyển và biểu hiện gen adenomatous polyposis coli (APC) thể hoang dã ở đường tiêu hóa, chuyển gen α -1 antitrypsin tới gan, chuyển yếu tố IX tới gan chuột và các tổ chức khác, sự biểu hiện gen nghiên cứu trong các tế bào gốc của máu và phôi động vật nguyên vẹn cũng đã thành công trong các mô hình động vật nhờ sử dụng liposome cationic. Gen α -1 antitrypsin được chuyển tới gan có thể tồn tại trên 5 tháng nếu kết

hợp cắt bỏ một phần gan. Các gen được chuyển qua trung gian liposome (ex vivo) vào trong các tế bào tủy xương chuột có thể có hoạt tính tới 4 tuần lễ nếu việc truyền được tái lập lại. Các liposome cationic cũng được sử dụng để ức chế sự tăng sinh của cơ trơn nội mạc mạch (chẳng hạn như vận chuyển các yếu tố gắn E2F) *in vivo* trong các thí nghiệm gây tổn thương động mạch cảnh chuột hoặc chuyển các gen mã cho interleukin-10 (IL-10) hoặc các domain receptor yếu tố alpha hoại tử u trên người (human tumor necrosis factor alpha -TNF α receptor) để làm giảm nhẹ các nội độc tố nguy hiểm. Sự biểu hiện qua trung gian liposome của gen luciferase ở động mạch vành lợn cũng được nâng cao do hoạt hóa tăng sinh tế bào mạch máu. Trong mô hình ở động mạch chủ thỏ, DOTMA/DOPE đã được dùng để chuyển cDNA hormone tăng trưởng của người, mặc dù chỉ có một phần nhỏ các tế bào động mạch (< 1%) biểu hiện là sản phẩm gen *in vitro*. Đối với mô mắt bao gồm các tế bào giác mạc, võng mạc, lông mi và võng mạc cũng đã được vận chuyển *in vitro* và *in vivo* với các lipid cationic, đó cũng là một trong những cách tiếp cận mới đối với các bệnh về mắt. Những chiến lược phát triển sự chuyển gen trong lâm sàng như thế đang trên đà phát triển.

Theo sau các nghiên cứu ban đầu của Canonico và cộng sự, việc chuyển gen tiền lâm sàng tới mũi động vật cũng đã thu được kết quả trong một số trường hợp. Những nghiên cứu này bao gồm cả việc thiết lập các lipid thể hệ cũ (DOTMA, DOTAP, DMRIE, DC-cholesterol) và các thuốc thử (chất phản ứng) thể hệ sau như GL-67. Việc chỉnh sửa các khiếm khuyết điện sinh học đường dẫn khí trong mô hình xơ nang ở chuột cũng áp dụng cách chuyển gen qua trung gian lipid. Chẳng hạn như việc phân phối các phức hợp DNA-lipid ở tĩnh mạch cũng sử dụng DOTMA/DOPE để biểu hiện gen *in vivo* ở các tế bào biểu mô trên bề mặt đường dẫn khí. Các tín hiệu biểu hiện gen trong một số trường hợp cũng được thông báo là có thể kéo dài được tới vài tháng bằng kỹ thuật này. Các lipid cationic hay các chế phẩm khác cũng có thể làm tăng thêm hoạt tính trong máu *in vivo*, trừ trường hợp hình thành phức hợp với DNA làm giảm hiệu lực của quá trình. Sự chuyển giao các plasmid đánh dấu phóng xạ có thể thực hiện được bằng các mô hình trên động vật với phóng xạ tự ghi trên toàn bộ cơ thể. Các liposome cationic đã được sử dụng để chuyển gen trị liệu tới một số khối u xác định hoặc được sử dụng trong vaccine kháng u có các chất phụ trợ. Với một lượng nhỏ HLA-B7 (khoảng vài microgram DNA được chuyển tới các mô bị u) đã phức hợp với DMRIE/DOPE hoặc DC-cholesterol có thể tiềm chủng an toàn cho các khối u hắc tố trong các nghiên cứu tiền lâm sàng ở người. Chiến lược này được thiết kế nhằm kháng lại các kháng nguyên gây khối u. Sự thoái lui một cách khách quan của các khối u cũng quan sát thấy ở một số bệnh nhân và hiệu lực kháng u đã đạt được ở một mức nào đó. Một bệnh nhân bị u hắc tố trong phổi (intrapulmonary melanoma) có biểu hiện đáp ứng sau khi HLA-B7 cDNA phức hợp với liposome cationic được chuyển vào qua động mạch phổi phải. Cần lưu ý rằng chính các liposome cationic cũng có hiệu lực kháng u trong một số mô hình *in vivo*.

Trên cơ sở các phát hiện trước của Nabel và cộng sự, nhiều thử nghiệm tiền lâm sàng vaccine đối với khối u hoặc các nghiên cứu tạo ra các mô hình nhằm nâng cao đáp ứng kháng khối u khi sử dụng lipid cationic phức hợp với DNA plasmid cũng đã khởi đầu. Một plasmid liên hợp các trình tự từ adeno-associated virus (AAV) mã cho IL-2 cDNA của chuột đã được tiêm vào các tế bào khối u tuyến tiền liệt của người. Liposome cũng đã được sử dụng để chuyển giao hiệu quả HVS-tk hoặc p53 tới các khối u mới hình thành ở chuột. Mặc dù có sự thoái lui của khối u, nhưng cơ chế của hiệu ứng kháng khối u thì vẫn còn phải nghiên cứu tiếp tục.

1.8 Vấn đề điều hòa phức hợp DNA-lipid

Mỗi công thức của phức hợp DNA-lipid đều đòi hỏi một tỷ lệ lipid:DNA xác định và các chế phẩm lipid tối ưu thường gồm cả lipid trung tính và lipid cationic. Các thử nghiệm tiền lâm sàng có thể được dùng trong việc xác định xem thuốc thử nào là tốt nhất cho một mục tiêu đặc biệt nào đó. Các nghiên cứu thuộc nhiều dạng ở pha I (pha I type) nhằm chứng minh cho các khái niệm khoa học cũng đã được đặt ra hoặc đang trên đà tiến triển. Một vài nghiên cứu còn đề cập tới cả sự tăng tiến của liều lượng. Một mô hình nghiên cứu lâm sàng với một công thức đã cho sẽ phải ước lượng được mức tăng của liều lượng. Phải tập hợp đầy đủ các số liệu thử nghiệm về hiệu lực, độ an toàn tiền lâm sàng để phục vụ cho các công việc sau này. Mặt khác, nếu một nghiên cứu lâm sàng theo mô hình nhằm thay đổi thành phần của một công thức đặc hiệu (chẳng hạn như thay đổi tỷ lệ lipid:DNA) thì mỗi sự thay đổi đều phải được nhìn nhận từ các thử nghiệm tiền lâm sàng về độ an toàn và hiệu lực của nó. Vì thế, trước hết phải sớm xác định một công thức tối ưu với các thành phần cố định trong các thử nghiệm tiền lâm sàng và sau đó đánh giá thật cẩn thận độ an toàn và hiệu ứng sinh học của công thức đặc hiệu này. Những tiếp cận như thế sẽ làm đơn giản hóa cho các nghiên cứu trên lâm sàng.

Chương II

CÔ ĐẶC DNA VÀ SỰ VẬN CHUYỂN GEN QUA TRUNG GIAN RECEPTOR

2.1 Mở đầu

Việc phát triển các chiến lược để đưa các yếu tố ngoại sinh, các gen chức năng đến các tế bào soma có lẽ là rất quan trọng cho việc điều trị bệnh, với điều kiện là các phương pháp này phải an toàn, hiệu quả và phải được chọn lọc. Những tiến bộ đạt được trong lĩnh vực này rất ấn tượng. Hiện nay có một số hệ thống chuyển gen đã được kiểm tra (làm test) trên các thử nghiệm lâm sàng. Các virus tái tổ hợp khiếm khuyết sao chép đã được sử dụng làm trung gian vận chuyển gen cho nhiều loại tế bào trong các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo*. Mặc dầu các virus tái tổ hợp có sự lỗi cuốn rất lớn, nhưng các vector này vẫn có những giới hạn đáng kể khi áp dụng vào thực tế. Ví dụ, các retrovirus tái tổ hợp có thể đưa được các gen vào trong tế bào nuôi cấy, nhưng các vector này lại không chuyển được gen vào trong các tế bào không sao chép (nhân lên) và nhìn chung thiếu hiệu quả trong việc chuyển gen *in vivo*.

Tính hướng của các virus tái tổ hợp có thể làm hạn chế tác dụng của chúng, và khả năng đóng gói của nhiều virus đã làm giới hạn kích cỡ các trình tự ngoại lai có thể được cài vào trong các vec tơ này. Một vài vector virus có thể gây độc tế bào hay kích thích các phản ứng dị ứng, làm giảm hiệu quả sự chuyển gen và biểu hiện gen chuyển nếu sử dụng lặp lại các virus tái tổ hợp. Cũng có vấn đề liên quan là một vec tơ virus bất hoạt có thể trở nên hoạt hóa sau khi thâm nhiễm các virus hoang dã hoặc virus trợ giúp và có thể tạo nên một virus tái tổ hợp có khả năng sao chép cao. Vì còn nhiều điều cần cân nhắc nên việc phát triển các phương pháp chuyển gen không virus vẫn cần được quan tâm nhiều.

Các gen chức năng có thể được đưa tới các tế bào nhận chuẩn *in vitro* bằng nhiều phương pháp vật lý, không gây thâm nhiễm. Tế bào của động vật có vú có thể được thâm chuyển bằng cộng tử calcium phosphate, liposome, DEAE-dextran, vi tiêm, thả bom các hạt gene và electroporation.

Một số kỹ thuật đã được mở rộng để chuyển DNA vào các tế bào động vật thực nghiệm *in vivo*. Ví dụ, cộng tử calcium phosphate (co-precipitation) được dùng để chuyển DNA vào trong các tế bào nuôi cấy bằng tiêu hóa nội bào (endocytosis) đặc hiệu và kỹ thuật này đã trở thành cách tiếp cận chuẩn cho sự chuyển gen *in vitro*. Các nhà nghiên cứu đã tiêm plasmid của calcium phosphate vào khoang màng bụng của chuột, kết quả là biểu hiện được gen chuyển ở gan với mức thấp. Mặc dầu những phương pháp thâm chuyển như thế có thể chuyển được DNA vào tế bào, nhưng ít hiệu quả hơn so với các vector virus và những kết quả thu được có thể thay đổi rất lớn. Thêm vào đó, những quy trình này chỉ cho kết quả biểu hiện ngắn hạn và thường là không đặc hiệu, hầu hết các kỹ thuật này là không thực tế đối với việc chuyển gen vào các động vật.

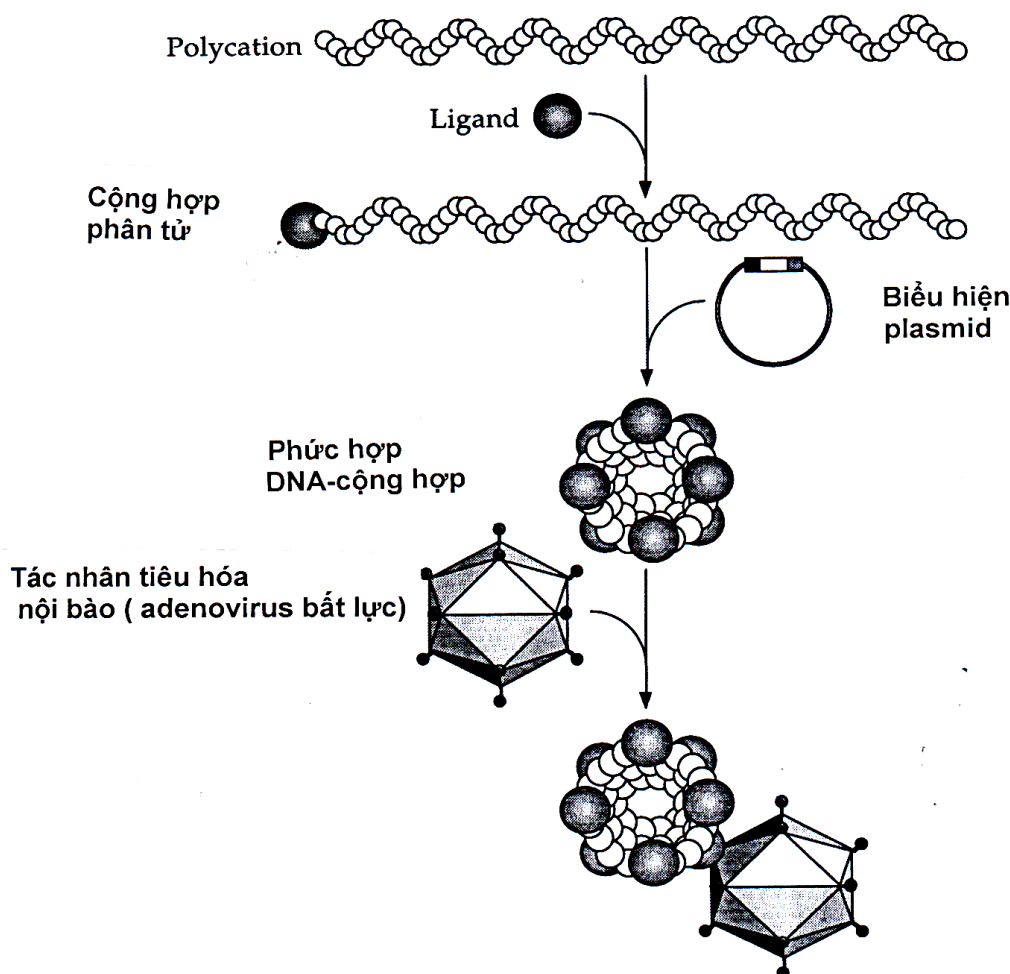
Tuy nhiên, một vài hệ thống không virus thể hiện như những phương thức tiếp cận tiềm năng đưa các gen chức năng vào động vật. Quả thực là những phương pháp chuyển gen không virus tiềm năng này có thể được sử dụng trong gen trị liệu trên người nếu những kỹ thuật này thật sự đáng tin cậy và có hiệu quả trong chuyển gen *in vivo*. Trong phạm vi chương này, chúng ta sẽ bàn đến sự phát triển và những tiến bộ đạt được trong sự

chuyển gen qua trung gian ligand-receptor. Một cách tiếp cận khác là chuyển gen qua trung gian liposome, đã được bàn đến ở chương 1.

2.2 Vận chuyển gen qua trung gian receptor

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng có thể chuyển được gen tới tế bào *in vitro* và *in vivo* bằng tiêu hòa nội bào (endocytosis) qua trung gian receptor (receptor-mediated endocytosis). Sự hòa nhập của các receptor bề mặt là một đáp ứng phổ biến của tế bào, và nhiều lớp receptor này có khả năng tiềm ẩn trong việc chuyển các gen chức năng vào trong tế bào. Việc chuyển các chức năng của ligand vào trong các tế bào nhờ tiêu hóa nội bào qua trung gian receptor rất đa dạng, và sự dịch chuyển của các receptor cũng rất thay đổi như receptor asialoglycoprotein được thiết kế để đưa các ligand của nó tới lysosome - nơi sau này chúng sẽ được giáng hóa. Các receptor khác lại quay vòng các ligand trở lại bề mặt tế bào (receptor transferrin) hay vận chuyển ligand của nó sang bên kia tế bào và được giải phóng ở đó (receptor Ig tổng hợp). Việc chuyển gen qua trung gian receptor là tận dụng lợi thế về khả năng của các receptor bề mặt tế bào để liên kết và hòa nhập các phức hợp lớn có chứa gen cần nghiên cứu và tạo nên tính đặc hiệu cho các vec tơ là không gây thâm nhiễm và không có độc tính. Mẫu thiết kế cơ bản của các cộng hợp phân tử trung gian cho sự chuyển gen gồm 2 yếu tố: ligand và polycation (Hình 2.1). Cấu trúc của cộng hợp phân tử được bắt đầu với việc lựa chọn một ligand thích hợp với đích là một receptor trên một dạng tế bào đặc hiệu. Tùy thuộc vào receptor mà nhiều ligand khác nhau đã được thêm vào cộng hợp như monosaccharide, disaccharide, peptide/protein, folate, glycoprotein, lectin và các kháng thể. Các ligand được liên kết đồng hóa trị với polycation (như polylysine), chúng tương tác điện với nhóm phosphate tích điện âm của khung DNA và tạo nên một phức DNA-cộng hợp ổn định thích hợp cho sự chuyển gen. Một khi ligand đã vào vào được bên trong tế bào thì sẽ trốn thoát được thể tiêu hóa nội bào (endosome) để được vận chuyển tới nhân. Vì thế một số nhà nghiên cứu đã hợp nhất nhiều tác nhân của endosome vào trong các cộng hợp phân tử (Hình 2.1).

Những cộng hợp phân tử này bắt chước chiến thuật sử dụng thật nhiều virus cùng đưa vào tế bào. Ở đây acid nucleic được cô đặc lại thành những hạt nhỏ nhờ các polycation, giống như sự đóng gói của hệ gen virus với protein vỏ của chúng. Sự nhận diện và hòa nhập của các virus cũng giống như sự hấp thu các cộng hợp phân tử vào trong tế bào động vật có vú. Như trường hợp các protein của adenovirus gắn với các receptor ($\alpha_v\beta_5$ integrin) trên bề mặt tế bào vật chủ và sau đó virus được hòa nhập bởi các hốc được bao với clathrin trong thể tiêu hóa nội bào (endosome) riêng biệt. Trái ngược với các vec tơ virus, hệ thống chuyển gen này không có sự ràng buộc về đóng gói và cho phép hướng đích tới các DNA plasmid kích thước lớn, cho phép vận chuyển được cả những gen chuyển mà còn cả các promoter và các yếu tố tăng cường.



Hình 2.1 Cấu trúc cơ bản của một phức hợp thâm chuyển. Các ligand đích liên kết đồng hóa trị với một polycation, chẳng hạn như poly-L-lysine sẽ cho phép cộng hợp (không cần liên kết đồng hóa trị) với DNA plasmid và tạo ra một phức hợp DNA- cộng hợp thích hợp cho sự chuyển gen. Các tác nhân thể tiêu hóa nội bào như các adenovirus bất hoạt hoặc các peptide hình que được thêm vào phức hợp thâm chuyển sẽ làm gián đoạn sự vận chuyển thể tiêu hóa nội bào (endosome) và kích thích sự biểu hiện các gen chuyển trong các tế bào tiếp nhận.
(Theo Assem Ziady và Thommas Ferkol. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999)

2.2.1 Đích ligand

Tính mới lạ của phương pháp chuyển gen này là khả năng đưa được DNA plasmids vào trong các tế bào đặc hiệu. Đích lựa chọn của các tế bào có lẽ là vấn đề rất quan trọng đối với GTL, vì nếu biểu hiện gen chuyển một cách bừa bãi thì rất bất lợi. Việc chuyển DNA ngoại sinh qua receptor bề mặt phụ thuộc vào một số yếu tố như sự hiện diện và số lượng các receptor đặc hiệu trên bề mặt tế bào đích, ái lực ligand –receptor và sự tương tác, tính ổn định của phức hợp DNA-cộng hợp cũng như quá trình tiêu hóa nội bào (THNB)

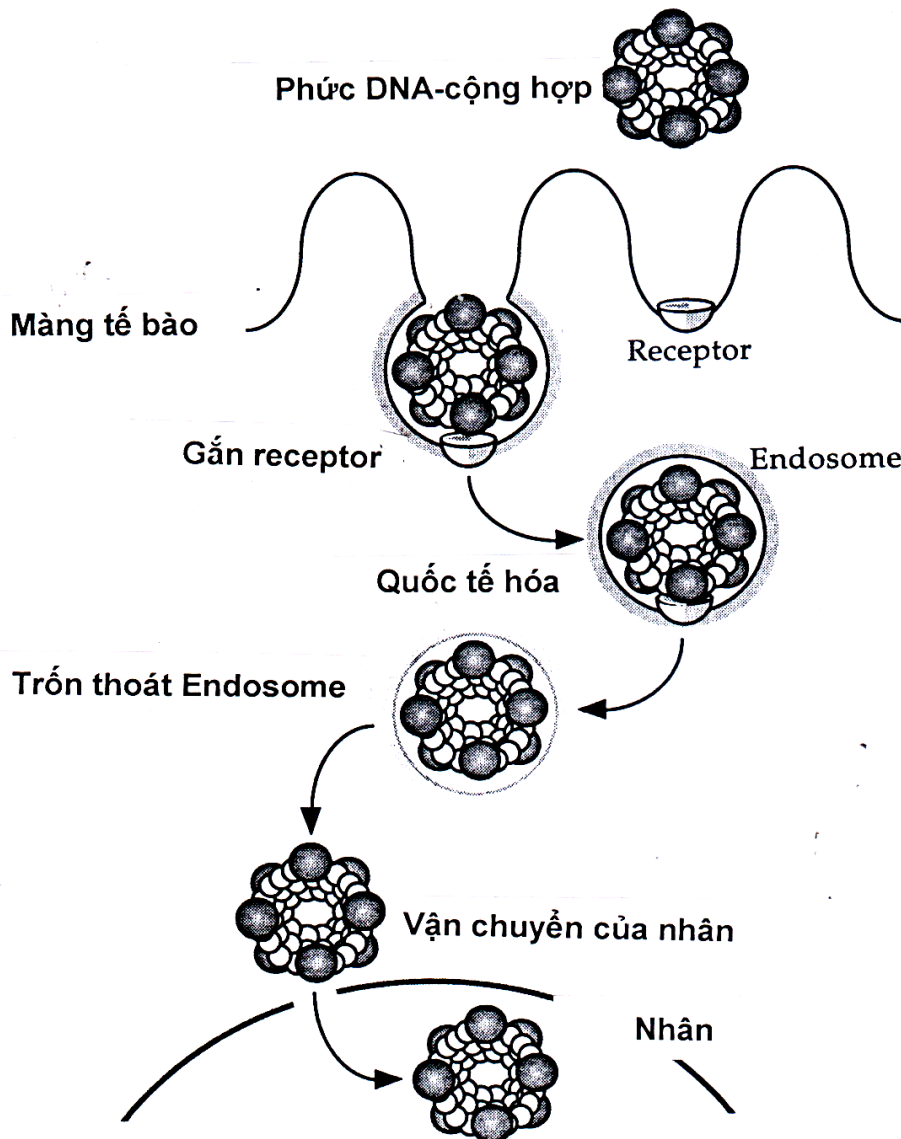
của phức hợp (Hình 2.2). Các receptor tế bào khác nhau được coi là những mục tiêu tốt cho sự chuyển gen (Bảng 2.1) và sự lựa chọn ligand là vấn đề then chốt cho tính đặc hiệu tế bào của sự chuyển gen. Trong chương này, chúng ta xem xét lại một vài receptor đặc hiệu được dùng để chuyển gen trực tiếp.

2.2.1.1 Receptor asialoglycoprotein

Do tầm quan trọng của nó trong sự chuyển hóa nên từ lâu gan đã được coi như là một đích hấp dẫn đối với GTL, và một số receptor biểu lộ ở gan đã được sử dụng để chuyển gen trực tiếp tới các tế bào gan (Bảng 2.1). Trong một công trình tương tự Wu và Wu đã mô tả một chất mang DNA đích hòa tan đã chuyển được plasmid tới các tế bào gan thông qua con đường receptor asialoglycoprotein. Receptor asialoglycoprotein là một glycoprotein hợp nhất màng có liên quan tới sự thanh thải các glycoprotein có đầu tận là galactose khỏi máu bởi THNB thông qua con đường hãm/ túi bao (coated pit/coated vesicle pathway) trong các tế bào gan. Mặc dầu với các tế bào gan, phần lớn đều được vận chuyển tới lysosome, nhưng vẫn có sự vận chuyển DNA thông qua receptor asialoglycoprotein và vì sự biểu hiện của receptor này chỉ giới hạn với các tế bào gan nên hệ thống tiềm năng này vẫn có khả năng được lựa chọn.

Để tạo được một ligand gắn với receptor các nhà nghiên cứu đã xử lý orosomucoid với neuraminidase để bộc lộ các galactose đầu tận và liên kết đồng hóa trị với glycoprotein desialate. Sự biểu hiện plasmid có chứa gen mã cho chloramphenicol acetyltransferase có sự phức hợp với cộng hợp phân tử và phức hợp tạo thành sẽ đích đặc hiệu tới các tế bào u gan người (HepG2) biểu hiện receptor asialoglycoprotein. Khi truyền phức DNA-cộng hợp vào chuột thấy có sự hấp thu và thanh thải nhanh của gan đối với DNA được tiêm vào. Một ngày sau khi xử lý với phức DNA-cộng hợp thì chloramphenicol acetyltransferase chỉ có hoạt tính ở gan và sự biểu hiện gen chuyển kéo dài được nhiều tuần khi động vật được cắt bỏ một phần gan ở thời điểm thâm chuyển. Theo cách tiếp cận này, chuột không có albumin huyết thanh Nagase sẽ được đưa vào tĩnh mạch phức hợp có chứa gen cấu trúc albumin người. Gen chuyển được phát hiện như một episome ở gan động vật sau 2 tuần được xử lý và đã xác định được có một lượng thấp albumin người trong máu động vật trong 4 tuần.

Cộng hợp với cơ sở asialoorosomucoid đã được sử dụng để hiệu chỉnh một phần những khiếm khuyết chuyển hóa liên quan tới gan. Wilson và cộng sự đã chuyển một gen chimeric có chứa cDNA của receptor lipoprotein tỷ trọng thấp tới gan thỏ Watanabe – một mô hình động vật về sự tăng cao cholesterol có tính chất gia đình. mRNA của receptor lipoprotein tỷ trọng thấp được phân lập sau một ngày được xử lý với phức DNA-cộng hợp, tuy nhiên không có bản phiên mã nào được phát hiện sau 3 ngày thâm chuyển. Mức cholestrol toàn phần trong máu thỏ được thâm chuyển cũng giảm 30% sau 2 ngày xử lý, nhưng hiệu ứng này chỉ là tức thì và nồng độ cholestrol lại trở lại mức trước khi xử lý sau thâm chuyển 5 ngày.



Hình 2.2 Sự chuyển gen qua trung gian receptor. Gen ngoại lai được cô đặc trong phức hợp thâm chuyển bởi cộng hợp phân tử, nó gắn với một receptor đặc hiệu trên bề mặt tế bào. Phức hợp receptor sau đó sẽ phải trải qua quá trình tiêu hóa nội bào và khi đã ở bên trong tế bào rồi thì nó trốn thoát được bộ máy THNB, dịch chuyển tới nhân và biểu hiện ở đó. Như vậy, sự biểu hiện của gen chuyển phụ thuộc vào sự hiện diện và số lượng receptor đặc hiệu trên tế bào tiếp nhận, tính ổn định của phức DNA-cộng hợp, sự tương tác ligand- receptor, tốc độ DNA tiến vào nhân, sự sống sót của gen chuyển và các tế bào công nghệ hóa, tốc độ phiên mã, dịch mã và quá trình sau dịch mã- tất cả đều liên quan chặt chẽ với hiệu quả của sự chuyển gen.

(Theo Assem Ziady và Thommas Ferkol. Gene Therapy Technologies, Applications and regulations. John Wiley & Sons Ltd 1999)

Bảng 2.1 Các receptor đích cho sự chuyển gen

Receptor	Ligand	Con đường tiêu hóa nội bào	Tế bào đích
Receptor asialoglycoprotein	Asialoorsomucoid Polylysine glycosyl hóa Histone glycosyl hóa	Lysosome	Tế bào gan
Carbonate	Kháng kháng nguyên Tn	Lysosome	Các tế bào ung thư, Lympho T
C-kit	Kháng thể kháng CD3	Lysosome	Các tế bào gốc tạo máu
CD	Yếu tố Steel (SLF)	Lysosome	TB lympho
Glycocalyx bề mặt TB	Lectin	Lysosome	Mọi nơi
Receptor yếu tố tăng trưởng bì (EGF)	Kháng thể kháng EGF	Lysosome	Mọi nơi
Receptor folate	Folate	Lysosome	Mọi nơi
Integrin	Peptide	Lysosome	Mọi nơi
Receptor mannosase	Polylysine glycosyl hóa	Lysosome	Đại thực bào
Receptor Ig tổng hợp	Kháng thể kháng plgR	Transytotic	TB biểu mô, TB gan
Phức hợp Phức hợp enzyme -serpin (SEC)	Peptide	Lysosome	TB gan, neuron đại thực bào
Receptor surfactant A hấp	Surfactant A	Lysosome	TB biểu mô đường hô
Receptor transferrin	transferrin	Quay vòng	Mọi nơi

Stankovics và cộng sự cũng thông báo rằng việc biểu hiện plasmid có chứa gen mã cho methylmalonyl CoA mutase có liên quan tới cộng hợp phân tử asialoorsomucoid-polylysine, nó làm tăng hoạt tính enzyme ở gan tới mức trị liệu cho các bệnh nhân có những sai lệch bẩm sinh về chuyển hóa acid niệu methylmalonic (methylmalonic aciduria). Tuy nhiên sự biểu hiện ở gan rất ngắn, sau khi được xử lý nó chỉ kéo dài chưa tới 2 ngày. Khi tiêm cộng hợp phân tử và phức hợp DNA-cộng hợp vào chuột thì nảy sinh đáp ứng kháng thể kháng ligand asialoorsomucoid, điều đó có thể làm giới hạn việc sử dụng của nó

trong các bệnh mạn tính. Nhưng không phát hiện thấy đáp ứng huyết thanh với DNA plasmid ở chuột sau khi tiêm. Đó là điều rất khích lệ vì nếu có các kháng thể kháng trực tiếp DNA thì khó có thể tiếp cận được với sự chuyển gen.

Một số nhà nghiên cứu lại sử dụng các ligand khác nhau đích vào các receptor asialoglycoprotein. Các cộng hợp phân tử bao gồm polylysine lactosyl hóa, histone galactosyl hóa và polylysine-albumin galactosyl hóa đã được sử dụng để chuyển các gen nghiên cứu tới các tế bào gan *in vitro*. Công trình gần đây của Perales và cộng sự đã chỉ rõ rằng một cộng hợp phân tử gồm có một polylysine đã được biến đổi hóa học với β -D-galactopyranonyl phenylisothiocyanate có thể đưa các gen chức năng vào các tế bào gan *in vitro* và *in vivo*. Và rõ ràng là một plasmid chứa cDNA yếu tố IX của người được cô đặc với polylysine galactosyl hóa đã được tiêm vào hệ tuần hoàn chuột. Các gen chuyển được đưa đặc hiệu vào gan chuột trưởng thành bằng cách cho hấp thu qua trung gian receptor, kết quả là kéo dài được sự biểu hiện của gen chuyển. mRNA yếu tố IX của người và protein chức năng phát hiện thấy trong nhiều tuần sau khi xử lý với phức hợp DNA-cộng hợp. Những kết quả tương tự cũng thấy ở thỏ Watanabe được tiêm phức hợp có chứa cDNA mã cho receptor lipoprotein tỷ trọng thấp. Mặc dầu các kết quả thu được vẫn chưa ổn định nhưng mức cholesterol nói chung là có giảm trong nhiều tuần ở một số thỏ sau khi tiêm phức hợp này (M.Molas, J.C. Perales và R.W. Hanson)

2.2.1.2 Receptor transferrin

Một đích tiềm năng khác cho sự chuyển gen là receptor transferrin – một glycoprotein dimer 180 kDa. Receptor này gắn với ligand tự nhiên của nó - transferrin, phức hợp được hòa nhập nhanh chóng rồi sau đó quay vòng ligand trở lại bề mặt tế bào. Receptor transferrin rất phổ biến, nó có ở hầu hết các màng tế bào nhân chuẩn đang phân chia như nguyên hồng cầu, các tế bào gan và đại thực bào. Con đường gây độc nội bào (endocytotic) đã được khai thác để chuyển thuốc và các độc tố tới các tế bào khối u *in vitro*.

Brinstiel và cộng sự đã chỉ rõ rằng plasmid có thể được vận chuyển qua receptor transferrin tới các tế bào dòng hồng cầu của chim và người *in vitro*. Các dạng tế bào khác tăng trưởng trong nuôi cấy sơ cấp cũng đã được chuyển giao. Sự hấp thu DNA bởi receptor này đạt hiệu quả rất cao và sự biểu hiện gen chuyển trong một số dòng tế bào có thể được nâng lên do được xử lý cùng với các tác nhân hướng lysosome. Việc chuyển và biểu hiện gen nghiên cứu (*P. Photinus pyralis* luciferase) sẽ bị ngăn chặn nếu cho dư transferrin vào môi trường và nó sẽ được tăng cường khi xử lý các tế bào vật chủ với các tác nhân (như desferrioxamine) làm tăng biểu hiện receptor transferrin. Khi thêm các hạt adenovirus bất hoạt vào phức DNA - cộng hợp cũng làm tăng sự biểu hiện gen chuyển. Kích cỡ của plasmid cũng ảnh hưởng phần nào tới hiệu ứng vận chuyển. Cotten và cộng sự đã thông báo rằng, các plasmid lớn khoảng 48 kilobase có thể chuyển được vào các tế bào thông qua receptor transferrin. Mới gần đây, cũng nhóm nghiên cứu này đã chuyển được các NST nhân tạo của vi khuẩn 160 kilobase với một hiệu ứng có thể so sánh được với các plasmid nhỏ hơn (A. Baker và Cotten). Kích cỡ của các phức hợp được xây dựng từ các cộng hợp cơ sở transferrin là rất quan trọng đối với sự chuyển gen và thường là với kích cỡ nhỏ hơn 100nm là tối ưu.

Receptor transferrin như là đích cho sự chuyển gen vào các động vật nguyên vẹn, nhưng khi tiêm phức hợp thâm chuyển này bao gồm cả adenovirus bất hoạt thì lại làm hạn chế

kết quả. Có thể là các đáp ứng viêm cùng với sự xâm nhập của adenovirus có ảnh hưởng tới sự tồn tại của các tế bào tương tự cũng tiềm ẩn khả năng được sử dụng trong các vaccine. Tuy nhiên, Zatloukal và cộng sự đã dùng cộng hợp cơ sở transferrin để chuyển gen interleukin-2 (IL-2) vào các tế bào u hắc sắc tố của chuột và đã tạo được cytokine với mức cao trong nuôi cấy. Trên cơ sở các dẫn liệu này thì các tế bào khối u đã được thâm chuyển *ex vivo* được ghép lại trên các mô hình động vật sẽ tác động như một vaccine do cảm ứng đáp ứng miễn dịch kháng u. Các thử nghiệm lâm sàng pha I nhằm kiểm tra lại khả năng ứng dụng của các quy trình này trên các bệnh nhân u hắc sắc tố ác tính.

Khi tiêm cục bộ phức DNA-cộng hợp cơ sở transferrin vào gan đã biểu hiện với mức cao gen nghiên cứu. Biểu mô đường dẫn khí của động vật nguyên vẹn cũng được thâm chuyển nhờ cộng hợp phân tử polylysine-adenovirus-transferrin và polylysine-transferrin người. Trong các thí nghiệm này, Gao và cộng sự sử dụng transferrin hoặc adenovirus đã vô hiệu hóa như là một ligand cũng như là một tác nhân ly giải endosome. DNA được phun qua khí quản gắn với cộng hợp này sẽ biểu hiện tức thì gen nghiên cứu mà đỉnh điểm là một ngày sau thâm chuyển và sẽ trở lại mức trước khi xử lý ở ngày thứ 7.

2.2.1.3 Receptor Ig tổng hợp

Phổi giữ vai trò chủ chốt như một tổ chức tiềm năng GTL với nhiều bệnh có liên quan tới gen cũng như không liên quan tới gen. Một số phương pháp chuyển gen có thể đưa được các gen vào trong TB đường hô hấp của động vật. Đáng tiếc là những cách tiếp cận này vẫn bị hạn chế và lại cần phải có các kỹ thuật khác để chuyển gen tới các TB biểu mô đường hô hấp qua trung gian các loại vec tơ, trong đó có receptor Ig tổng hợp (Bảng 2.1).

Receptor Ig tổng hợp thích ứng đặc biệt cho việc hòa nhập và vận chuyển không gián đoạn các đại phân tử (như dimer IgA, pentamer IgM) qua biểu mô và các tế bào gan. Đặc biệt là sự phân phối của các receptor này trong biểu mô đường dẫn khí và trong các tế bào chủ chốt tuyến dưới niêm mạc của người đã dẫn đến sự suy đoán rằng receptor này có thể là một đích hấp dẫn cho việc điều trị các bệnh về phổi giống như bệnh xơ nang chẳng hạn.

Rõ ràng là các plasmid liên kết không đồng hóa trị với mảnh Fab của kháng thể kháng trực tiếp thành phần tiết của người, các domain ngoại bào tương (ectoplasmic) của receptor đã được đưa vào các tế bào biểu mô khí quản người. Ferkal và cộng sự đã chỉ rõ rằng đích của các receptor Ig tổng hợp là vận chuyển đặc hiệu và biểu hiện tức thời các gen nghiên cứu tới các tế bào biểu hiện receptor này *in vitro* ngay cả khi có một lượng dư ligand tự nhiên của receptor. Tuy nhiên, việc chuyển giao các plasmid lại bị ức chế nếu cho dư thành phần tiết của người, có lẽ do thành phần này đã chiếm chỗ vị trí nhận biết trên mảnh Fab và vì thế mà ngăn chặn sự tương tác của nó với receptor. Hiệu ứng thâm chuyển các tế bào biểu mô khí quản người phát triển bằng nuôi cấy rất biến đổi và những biến đổi này đều có liên quan tới những khác biệt về mức độ biểu hiện của receptor.

Receptor Ig tổng hợp đã đưa được plasmid vào các mô biểu hiện receptor này *in vivo*. Trái ngược với đích của các tế bào biểu mô đường dẫn khí thông qua receptor transferrin, phức DNA-cộng hợp được phân phối trong hệ tuần hoàn vì receptor Ig tổng hợp định vị chủ yếu trên bề mặt phía kiểm tính của các tế bào biểu mô. Khi sử dụng luciferase và (*lacZ*) β -galactosidase của *E. coli* như là chất nghiên cứu thì thấy mô hình biểu hiện gen

chuyển cũng tuân theo sự phân phối không gian của các tế bào biểu hiện receptor này. Đây là sự biểu hiện tức thời, kéo dài dưới 12 ngày sau khi tiêm. Tuy nhiên, đã xuất hiện một đáp ứng huyết thanh thật sự kháng trực tiếp mảnh Fab của phức hợp, bằng chứng là giảm sự biểu hiện gen ở phổi và gan ở các lần xử lý tiếp theo. Rõ ràng là những chương ngại miễn dịch này cần phải được tháo gỡ trước khi ứng dụng các vec tơ này trong lâm sàng.

2.2.1.4 Receptor mannose

Các đại thực bào mô cũng là một mục tiêu tiềm năng để biến đổi gen, các gen được chuyển trực tiếp tới các tế bào này thông qua mannose receptor. Receptor mannose biểu lộ ở nhiều tiểu type (subtype) đại thực bào và các glycoprotein được hòa nhập với các gốc mannose, glucose, fucose và N-acetylglucosamine. Cũng giống như receptor asialoglycoprotein, các ligand hòa nhập bởi receptor mannose được chuyển tới lysosome. Cộng hợp glycoprotein nhân tạo được cấu trúc theo kiểu polylysine được glycosyl hóa với các monosaccharide và được dùng để chuyển gen qua trung gian receptor tới các đại thực bào của người và chuột trong nuôi cấy sơ cấp. Hiệu ứng thâm chuyển rất biến động, nhưng sự biểu hiện gen chuyển luôn gắn với các dấu chuẩn của các tế bào đơn nhân/đại thực bào (monocyte/macrophage marker). Sự hấp thu gen nghiên cứu được thực hiện qua trung gian tương tác đặc hiệu giữa phức hợp với receptor mannose, vì thế nếu cho thừa albumin huyết thanh bò đã mannosyl hóa vào môi trường nuôi cấy trước khi thâm chuyển thì sẽ làm ức chế sự biểu hiện gen nghiên cứu. Các plasmid phức hợp với cộng hợp glycoprotein có mannose đầu tận đã được đưa vào các đại thực bào của lợn gặm nhấm thông qua receptor mannose. Phức hợp này được tiêm vào hệ tuần hoàn chuột trưởng thành. Các gen nghiên cứu đã được chuyển tới tổ chức lưới nội mô chuột mặc dầu hiệu ứng thâm chuyển là thấp và thời gian biểu hiện gen chuyển ngắn, hiệu ứng cao nhất ở ngày thứ 4 sau thâm chuyển.

2.2.2 Sự cô đặc và hình thành phức DNA

Theo các báo cáo ban đầu, sự chuyển gen qua trung gian receptor asialoprotein phụ thuộc phần nào vào kích thước các hạt DNA cô đặc. Thật vậy, polycation có thể được coi như một phương tiện kết dính ligand với DNA của plasmid. Phương pháp cô đặc được sử dụng trong những thí nghiệm này có liên quan tới các kỹ thuật, trong đó DNA được ủ với một lượng dư polycation, sau đó được thẩm tích kháng gradient NaCl. DNA cô đặc dần dần thành những hạt đa phân tử tích điện dương kích cỡ đường kính khoảng 150-200 nm. Kích cỡ của phức DNA-cộng hợp có thể là rất quan trọng đối với sự chuyển gen vì nhiều receptor THNB kháng lại rõ ràng các ligand với các kích cỡ xác định. Wagner và cộng sự đã chỉ rõ rằng độ cô đặc của phức hợp có liên quan tới mức độ biểu hiện gen chuyển. Đặc biệt là phức hợp DNA-cộng hợp đã được cô đặc thành những cấu trúc hình phỏng xuyên (toroid structure) với đường kính 80-100 nm là hiệu lực nhất đối với sự chuyển gen vào các tế bào phát triển trong nuôi cấy. Parales và cộng sự lại phát triển một phương pháp cô đặc khác để plasmid thể hiện là các hạt nhỏ, phù hợp với sự chuyển gen, và đã xác định rằng các điều kiện này rất quan trọng cho sự ổn định của phức hợp được tạo nên từ DNA nồng độ cao. Hệ thống này có liên quan với việc thêm dần một lượng rất nhỏ cộng

hợp polycation-ligand vào DNA plasmid. Nhờ việc điều chỉnh nồng độ NaCl trong dung dịch mà những phức hợp “đơn phân tử” (unimolecular) được tạo thành chỉ có đường kính chừng 10-20 nm. Phức hợp này có bề mặt trung hòa điện nên có thể tránh được sự hoạt hóa bề mặt và tạo nên một vec tơ hiệu ứng cao hơn cho sự chuyển gen vào động vật.

Độ cô đặc DNA của phức DNA-cộng hợp phụ thuộc vào một số biến cố như nồng độ NaCl, độ dài của chuỗi polylysine cũng như kích cỡ, trình tự và trạng thái sinh lý của DNA. Độ dài của polylysine tác động tới nồng độ NaCl cần cho sự hình thành và duy trì các phức hợp này. Cấu trúc bậc hai của polycation cũng ảnh hưởng tới cấu trúc phức hợp. Các peptide tổng hợp được sắp đặt trong các cấu hình khác nhau (uốn khúc ngẫu nhiên, xoắn α và các cấu trúc tấm β) gắn với DNA sẽ tạo nên tổng thể đa phân tử có thể không thích hợp cho sự hấp thu qua trung gian receptor. Cuối cùng là, cấu trúc của cộng hợp phân tử cũng tác động tới việc gắn nó vào DNA. Sự tương tác của polycation với DNA có thể mất ổn định do tăng thay thế ligand. Nếu thay thế nhiều polycation sẽ làm thấp đi ái lực của nó với DNA, có lẽ do sự cản trở không gian và kết quả là phức hợp được nối rộng ra quá lớn gây khó khăn cho sự hòa nhập. Các gen muốn được vận chuyển một cách hiệu quả qua phức hợp enzyme-serpin *in vitro* thì chỉ được thay thế một ít polycation. Tuy nhiên, chỉ riêng poly-L-lysine cũng đã tạo được các phức nhỏ nhất, nhưng lại không có hiệu ứng với các tế bào thâm chuyển. Ngoài ra, mẫu và thời gian biểu hiện gen chuyển cũng có sự thay đổi, nó phụ thuộc vào chiều dài của chuỗi polycation mặc dầu các cộng hợp phân tử đều có cùng độ cô đặc DNA.

Wagner và cộng sự đã phát hiện rằng cộng hợp phân tử với các ligand bán phần ít hơn thì hiệu ứng hơn đối với sự chuyển gen nghiên cứu bằng THNB qua trung gian receptor. Các cộng hợp có chứa khoảng 1 transferrin/100 gốc lysine thì biểu hiện được tối đa gen chuyển trong các dòng tế bào hồng cầu người. Tuy nhiên, việc thay thế từng phần cộng hợp cơ sở transferrin với polylysine đã tạo được các cấu trúc hình phỏng xuyên và hoạt tính của luciferase được nâng lên cao hơn.

Sự cô đặc DNA plasmid bởi polycation có thể làm tăng thêm lợi thế vì DNA cô đặc rất quan trọng đối với sự ổn định của nó trong máu và trong tương bào của các tế bào đích. Trong lượng phân tử cao của DNA ảnh hưởng đặc biệt tới việc làm giảm bớt lực liên kết hydro và đời sống bán phần của nó trong máu ngắn có lẽ do bị phân giải bởi nuclease. Polycation có thể ảnh hưởng tới sự tồn tại của DNA ngoại sinh trong các bể endosome tương bào, bởi vì DNA plasmid được làm cô đặc với polylysine kháng mạnh hơn với sự phân giải của nuclease nội bào (endonuclease). Một số polycation khác cũng đã được sử dụng trong chuyển gen. Chất được sử dụng rộng rãi nhất là tác nhân cô đặc DNA (poly-L-lysine), nhưng poly-L-ornithine và poly-L-lysine chỉ được sử dụng đối với các tế bào thâm chuyển *in vitro*.

Điều thú vị là các plasmid không liên kết đồng hóa trị với poly-L-lysine thì biểu hiện rất nghèo nàn, có lẽ nó liên quan tới việc poly-L-arginine liên kết DNA với ái lực lớn hơn poly-L-lysine và nó có thể ngăn ngừa được sự tương tác của các yếu tố phiên mã với các gen chuyển (A. Ziady, T. Ferkol và P.B Davis). Các acid poly-L-amino có thêm lợi thế là nó được coi như là các phương tiện chuyển gen. Vì các acid poly-L-amino không phải là kháng nguyên, nó bị phân hủy và chuyển hóa tức thời. Trái lại, các peptide được cấu tạo từ các D-isomer của các amino acid thì lại kháng một cách tương đối với sự phân giải. Cuối cùng, người ta đã thừa nhận rằng poly-L-lysine có thể hoạt động với tư cách như một tín hiệu định vị nhân và có thể có hiệu ứng hơn trong việc đích các phức DNA-cộng hợp tới nhân khi nó đã được hòa nhập.

Nhiều polymer cationic tổng hợp đã thể hiện rõ ràng là trung gian cho sự chuyển gen vào trong tế bào. Các polymer nói theo cách khác là các dendramer vượt trội trong việc chuyển các gen nghiên cứu tới các dạng tế bào khác nhau *in vitro*. Khi tạo các phức chỉ gồm các điện tích dương, Szoka và cộng sự đã thu được hiệu ứng thâm chuyển tối ưu nhờ việc sử dụng các dendramer có đường kính 6.8 nm, và sự cộng hợp của các polymer với một protein màng không ổn định sẽ nâng cao hơn nữa hiệu ứng chuyển gen. Polyethylenimine, một polymer hữu cơ phân nhánh cao được tổng hợp bởi sự trùng hợp aziridine đã được sử dụng như một protein gắn DNA cũng như một tác nhân làm phân rã lysosome. Bousif và cộng sự sử dụng chúng để đưa các plasmid có chứa gen nghiên cứu luciferase vào trong các tế bào của hệ thần kinh trung ương. Nhưng polyethylenimine tác động như một “lớp thấm proton” (proton sponge) trong thể THNB (endosome).

Các phân tử gắn DNA đã được sử dụng để gắn plasmid với các ligand và chuyển gen vào các tế bào động vật có vú. Các nucleoprotein cũng giống như histone và protamine đã được sử dụng như là một polycation trong một số cộng hợp phân tử. Tác nhân tương tác bisacridine đã được cải biến hóa học có chứa các gốc galactose tận cùng được sử dụng để chuyển DNA vào trong các tế bào biểu hiện receptor asialoglycoprotein. Nhờ việc sử dụng các cấu trúc đã được đổi mới mà Forminaya và Wels đã tận dụng ái lực cao của chất hoạt hóa phiên mã của nấm men GAL4 đối với các trình tự DNA đặc hiệu để gắn các plasmid vào các cộng hợp phân tử và các tế bào thâm chuyển *in vitro*.

Kích cỡ và cấu hình của DNA có thể là các biến số quan trọng đối với việc chuyển gen, tuy thể DNA plasmid thì không cần phải cô đặc thành những hạt nhỏ để được hấp thu vào một số mô. Wolff và cộng sự đã chứng minh rằng việc chuyển trực tiếp DNA tinh khiết vào cơ thể sẽ kéo dài được sự biểu hiện của các gen nghiên cứu trong sợi cơ. Các plasmid vẫn còn duy trì một NST phụ (extrachromosome) trong nhân vật chủ và nó tồn tại nhiều tháng với tư cách là các episome không sao chép. Mặc dầu các dạng tế bào khác đã được thâm chuyển với cách tiếp cận này, nhưng nó chỉ tương đối đặc hiệu với cơ. Vì thế việc ứng dụng tiêm trực tiếp DNA có thể vẫn bị hạn chế.

2.2.3 Sự lưu chuyển và tẩu thoát theo kiểu tiêu hóa nội bào

Các vector không virus đưa gen chuyển vào tế bào bằng THNB qua trung gian receptor đơn giản là thâm nhập qua lớp hàng rào của màng tế bào để đưa các gen ngoại sinh tới tương bào của tế bào đích. Sự biểu hiện của các gen chuyển đòi hỏi chúng phải tẩu thoát khỏi các bể endosome để rồi được chuyển tới nhân. Trong trường hợp receptor asialoglycoprotein thì sự lưu chuyển của các ligand bị sút kém. Mặc dầu vậy lycoprotein có galactose đầu tận đã được chuyển tới lysosome các tế bào gan chuột sơ cấp, nhưng vẫn chưa bị thoái hóa hoàn toàn và một số asialoglycoprotein đã hòa nhập nhưng vẫn không bị phân hủy. Các phức DNA-cộng hợp được đưa vào qua receptor này có thể cũng tránh được sự phân hủy tương tự như thế. Mặc dầu các phức DNA-cộng hợp bắt chước các quá trình tiến vào của virus, nhưng chúng vẫn không được giải phóng khỏi bộ máy endosome. Trên thực tế, sự biểu hiện gen chuyển bị giới hạn bởi việc bẫy hoặc giáng hóa của các phức hợp trong các thể THNB (Hình 2.2). Hiệu ứng của sự chuyển gen thông qua THNB trung gian receptor có thể được nâng cao bằng cách ngắt sự lưu chuyển nội bào của phức DNA-cộng hợp. Có thể sự hiện diện của polycation trong cộng hợp phân tử đã cho phép các phức DNA-cộng hợp tẩu thoát khỏi thể THNB. Cotten và cộng sự đã chỉ rõ rằng chloroquine - một tác nhân hướng lysosome đã can thiệp vào sự acid hóa các

lysosome và ức chế enzyme thủy phân do đó đã nâng cao đáng kể sự biểu hiện gen chuyển trong các tế bào dòng hồng cầu (dòng tế bào K562) thâm chuyển với cộng hợp polylysine-transferrin. Chloroquine cũng làm tăng sự biểu hiện của các gen chuyển đã được chuyển tới các dạng tế bào khác như các tế bào gan và đại thực bào người bằng sự THNB qua trung gian receptor. Tác nhân được lý khác là colchicine cũng làm tăng sự tồn tại của các gen chuyển *in vivo* do nó can thiệp vào sự lưu chuyển của các endosome bằng cách phá vỡ các vi ống.

Một số nhà khoa học đã dùng các adenovirus để kéo dài sự tồn tại của đại thực bào nhờ quá trình THNB qua trung gian receptor. Việc điều hòa pH của THNB là rất cần thiết cho sự lưu chuyển thích hợp của các ligand trong các chặng đường nội bào và pH các bể của thể THNB sẽ trở nên acid hơn khi nó tới lysosome. Sự acid hóa của các thể THNB (endosome) muộn sẽ làm thay đổi cấu trúc các protein capsid của adenovirus và gây nên sự tương tác protein và màng bể, vì thế mà phá vỡ thể THNB. Từ quan sát này đã dẫn đến giả thuyết cho rằng sự phá vỡ thể THNB bởi adenovirus có thể sẽ kéo dài sự tồn tại và biểu hiện của gen chuyển. Curriel và cộng sự đã khai thác đặc tính này của virus và cho tăng gấp đôi số adenovirus khiếm khuyết sao chép vào các cộng hợp phân tử cơ sở transferrin. Những cộng hợp phân tử gắn adenovirus đã làm tăng đáng kể sự biểu hiện của các gen chuyển ở nhiều dạng tế bào *in vitro*. Hơn nữa, các gen nghiên cứu cũng đã được đưa vào các tế bào biểu mô đường dẫn khí *in vivo* qua đường khí quản nhờ việc sử dụng polylysine-adenovirus và các vec tơ polylysine-adenovirus-transferrin. Cristiano và cộng sự đã cải tiến các cộng hợp phân tử cơ sở asialoorsomucoid bằng cách cho thêm các adenovirus bất hoạt vào vectơ và đã chứng minh rằng việc tăng gấp đôi adenovirus ở các phức DNA-cộng hợp đã làm tăng sự vận chuyển gen nghiên cứu vào các tế bào gan nuôi cấy. Các virus khác (như virus làm chết phôi gà –chicken embryo lethal orphan virus) cũng được sử dụng để làm tăng sự biểu hiện của gen chuyển.

Protein bề mặt của các virus khác cũng có hiệu ứng tương tự đối với sự tồn tại và biểu hiện gen chuyển vì nó cho phép thể THNB hòa với màng virus. Wagner và cộng sự đã chỉ rõ rằng các trình tự peptide từ hemagglutinin HA2 của influenza gắn với cộng hợp phân tử polylysine transferrin làm tăng đáng kể mức biểu hiện gen chuyển ở các tế bào nuôi cấy. Các nhà khoa học khác lại thiết lập các peptide tổng hợp bắt chước chức năng THNB của các protein virus. Các peptide khác như protein hòa nhập của virus hợp bào đường hô hấp hay các peptide giải phóng thể THNB tổng hợp cũng có hiệu ứng tương tự đối với việc giải phóng và tồn tại của các DNA ngoại sinh. Tuy nhiên, với việc cho thêm các protein này sẽ làm hạn chế tiềm năng của phức hợp, vì sự liên kết của peptide với cộng hợp có thể lại sinh ra tính miễn dịch của phức hợp.

2.2.4 Xác định đích và sự chuyển vị nhân

Mục tiêu cuối cùng của sự chuyển gen là đưa DNA ngoại sinh vào nhân, ở đó gen chuyển có thể trải qua sự phiên mã (Hình 2.2). Quá trình lưu chuyển nhân của các phức hợp DNA xảy ra khi chúng đã thoát khỏi sự THNB. Tuy nhiên, quá trình vận chuyển gen qua trung gian receptor vẫn còn biết đến rất ít. Việc tiến vào nhân của các phức DNA-cộng hợp có thể là một quá trình ngẫu nhiên, thụ động và đơn giản là có liên quan tới tổng số các bản phiên mã của gen chuyển có ở tương bào. Có lẽ sự vận chuyển gen tới nhân đòi hỏi phải có sự phân chia tế bào và không có sự hợp nhất của vỏ nhân khi phân bào (mitosis), và cho phép DNA của NST phụ (extrachromoisome) vào trong nhân. Hiệu ứng của sự chuyển

gen thông qua receptor asialoglycoprotein rõ ràng được tăng lên khi gan được tái sinh do cảm ứng bởi việc cắt bỏ một phần. Tuy nhiên, vẫn chưa xác định được mức độ quan trọng của sự phân chia tế bào đối với việc xác định đích của gen chuyển tới nhân. Thực tế là các gen nghiên cứu có thể được vận chuyển hiệu quả vào các tế bào không phân chia, điều đó chứng tỏ rằng nó không tuân theo cơ chế này. Sự biểu hiện gen chuyển ở gan cũng kéo dài đáng kể ở các động vật được cắt bỏ một phần gan, mặc dầu vẫn chưa xác định được liệu các gen ngoại sinh có hợp nhất được vào hệ gen tế bào vật chủ hay không. Thực vậy, nhiều DNA được vận chuyển bởi cộng hợp phân tử này vào trong tế bào, nó tồn tại như các episome trong nhân nhưng trong các tế bào thâm chuyển lại không thấy sự tồn tại này. Việc kéo dài sự tồn tại của gen nghiên cứu có thể có liên quan tới sự tẩu thoát gen chuyển khỏi con đường receptor asialoglycoprotein, vì thế mà tránh được sự phân giải trong lysosome và cho phép DNA duy trì được trong các bề tương bào mà không bị thủy phân.

Một giả thuyết thuyết phục khác là thành phần polylysine của chất mang có thể đã trợ giúp cho sự lưu chuyển nhân của các DNA. Nòng cốt nhất là một số protein virus đáp ứng sự chuyển vị hệ gen virus tới nhân, có các trình tự giàu lysine. Trình tự amino acid Phe-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val được dùng để vận chuyển kháng nguyên T virus -40 của khỉ (simian virus-40 (SV-40) large T antigen) tới nhân các tế bào động vật có vú và trình tự Lys-Lys-Lys-Tyr-Lys-Leu-Lys tác động như một tín hiệu định vị nhân đặc hiệu cho các protein chất nền của HIV-1.

Các nucleoprotein cũng được sử dụng như một polycation hoặc một tín hiệu định vị nhân trong một số cộng hợp phân tử. Đặc biệt những dạng khác nhau của histone và protamine đã được sử dụng để chuyển các gen chức năng. Khi thêm histone H4 vào các cộng hợp cơ sở transferrin đã làm tăng sự biểu hiện gen chuyển trong tế bào *in vitro*. Histone H1 cải biến hóa học có gốc galactose đầu tận đã được sử dụng để đưa các gen nghiên cứu vào trong các tế bào u gan thông qua receptor asialoglycoprotein. Cơ chế của việc protein này kích thích sự chuyển gen thì vẫn chưa được xác định.

Trong hệ thống này, DNA plasmid không hợp nhất vào hệ gen tế bào vật chủ và các gen chuyển vẫn duy trì ở dạng episome. Bởi vậy gen này hầu như không tồn tại ở nhân các tế bào thâm chuyển và đó chỉ là sự biểu hiện tức thời. Thời gian biểu hiện của gen chuyển cũng thay đổi, nó phụ thuộc vào mô và dạng tế bào tải nạp, và có thể liên quan tới sự tồn tại của các tế bào tiếp nhận. Rõ ràng là các gen có thể được đưa vào vật chủ khi tế bào đích đã chết. Chính sản phẩm của gen chuyển cũng có thể tác động tới sự tồn tại của các tế bào đã được công nghệ hóa. Sự biểu hiện của một gen nghiên cứu có thể cảm ứng đáp ứng miễn dịch tế bào, gây thải loại các tế bào thâm chuyển và làm hạn chế sự biểu hiện của gen chuyển. Chất tạp exotoxin của các chế phẩm plasmid đã được Cotten và cộng sự chỉ rõ là sẽ làm tổn thương các tế bào sơ cấp *in vitro* và tác động lên sự biểu hiện của các gen nghiên cứu. Vì thế việc sử dụng DNA tinh khiết như một dược phẩm là rất cần thiết.

Sự mất mát DNA trong quá trình vận chuyển tới các tế bào vật chủ đã làm hạn chế rất nhiều cho các hệ thống này. Một số nhà khoa học đã thiết kế các vec tơ DNA nhằm kéo dài sự tồn tại của gen chuyển. Vec tơ episome tự sao chép được có chứa các trình tự virus tác động như gốc sao chép (origin of replication) có thể cho phép gen chuyển tồn tại được trong các tế bào đang phân chia. Ngoài ra, các NST nhân tạo cũng được phát triển để chuyển giao và biểu hiện liên tục chẳng những các gen chuyển (cDNA hoặc gen nguyên vẹn) mà cả với các promoter và yếu tố tăng cường.

2.3 Kết luận

Nói tóm lại, nhiều cộng hợp phân tử đã được sử dụng để chuyển các gen ngoại lai, các gen chức năng vào trong các tế bào động vật có xương sống bằng quá trình THNB trung gian receptor. Sự chuyển gen qua trung gian receptor là một phương pháp không gây thâm nhiễm, linh hoạt, chuyển được DNA cô đặc tới các tế bào đích đặc hiệu *in vitro* và không có sự hợp nhất các tác nhân ly giải endosome vào trong các cộng hợp phân tử nên nâng cao đáng kể sự biểu hiện gen chuyển. Mặc dầu có các lợi thế tiềm ẩn (Bảng 2.2), nhưng các hệ thống chuyển gen này lại cho các kết quả rất biến đổi *in vivo*. Khi đưa các gen nghiên cứu vào gan đã kéo dài sự biểu hiện và dường như là nó có liên quan tới kích thước và cấu hình của DNA plasmid. Mặt khác, các gen được vận chuyển bằng cộng hợp phân tử đã biểu hiện tức thời trong các mô với mức thấp *in vivo* mặc dầu đã có những cải biến trong các phức hợp nhằm thúc đẩy sự tồn tại của các gen chuyển trong các tế bào tiếp nhận.

Bảng 2.2 Sự chuyển gen qua trung gian receptor

Những tiện lợi

Không thâm nhiễm
Chuyển hiệu quả DNA plasmid tới các tế bào *in vitro*
Chuyển được các gen ngoại lai tới các tế bào có receptor thích hợp
Không bị bó buộc về kích cỡ trong việc chuyển DNA ngoại lai
Có thể chuyển được nhiều gen tới tế bào
Sự thâm chuyển hay biểu hiện gen chuyển không đòi hỏi phải có sự sao chép tế bào
Thêm các tác nhân ly giải THNB sẽ làm tăng sự tồn tại của gen chuyển
Các gen chuyển vẫn duy trì NST phụ

Những bất tiện

Ít hiệu quả trong việc chuyển DNA plasmid tới các mô *in vivo*
Thời gian biểu hiện gen chuyển ngắn
Sự biểu hiện của gen chuyển ở mức thấp và biến động
Ligand hoặc các bán phần ly giải THNB có thể là tác nhân gây miễn dịch.

Một số nhà nghiên cứu đang hướng tới việc giải quyết các giới hạn này bằng cách hợp nhất các đặc tính phức hợp phân tử vào trong các phương tiện vận chuyển gen như liposome chẳng hạn. Sự cô đặc DNA plasmid với các protein cơ sở như polylysine cho thấy, để nâng cao việc chuyển gen bởi các liposome cationic thì phải nâng cấp sự nang hóa của DNA và khả năng THNB của phức hợp. Các liposome có xu hướng hòa nhập với tất cả các tế bào và khi thêm ligand vào phức DNA -lipid sẽ cho phép vận chuyển chọn lọc các gen tới tế bào đích.

Các vec tơ chimera cũng được thiết kế để gắn với các yếu tố của hệ thống có virus cũng như không virus. Một số nhà nghiên cứu đã gộp các protein virus vào trong các cộng hợp phân tử để tăng cường sự chuyển giao và biểu hiện gen chuyển. Cũng có thể là các virus tái tổ hợp cải biến có thể gộp được các ligand sẽ làm cho chúng hướng được đích tới các tế bào biểu hiện receptor. Virus gây bệnh bạch cầu ở chuột ecotropic Moloney được cải

biến hóa học với lactose đã hướng đích tới receptor asialoglycoprotein các tế bào u gan Hep G2. Sau chót phải kể đến là Kasahara và cộng sự đã công nghệ hóa vỏ của retrovirus ecotropic có chứa erythropoietin và vec tơ lai này đã được sử dụng để vận chuyển các gen chuyển tới các tế bào của chuột và người biểu hiện receptor erythropoietin. Retrovirus của chim cũng được cải biến để biểu hiện được integrin trên bề mặt của chúng và được dùng để thâm nhiễm các tế bào nhân chuẩn. Những chimera này có thể cho phép xác định được đích đặc hiệu mô của các virus tái tổ hợp nhờ sự tương tác của ligand với các receptor bề mặt tế bào và có thể sẽ là đại diện cho sự chuyển gen qua trung gian receptor trong tương lai.

Chương III

NHIỄM SẮC THỂ ĐỘNG VẬT CÓ VÚ – VIỄN CẢNH CỦA GEN TRỊ LIỆU

3.1 Mở đầu

Hiệu lực của GTL đối với việc điều trị bệnh sẽ phụ thuộc rất lớn vào việc thiết kế một cách thích hợp các chất mang (carrier) để chuyển gen *in vivo*. Trong tế bào, một thành phần tự nhiên đã được thiết kế cho mục đích này đó là nhiễm sắc thể. Vì thế cách tiếp cận logic là bắt chước cách thức làm việc của tự nhiên, tức là phải tạo ra được một NST nhân tạo của động vật có vú (mammalian artificial chromosome – MAC).

Những hiểu biết của chúng ta hiện nay về các thành phần di truyền tạo nên một NST có chức năng đầy đủ còn rất hạn chế. Mặc dầu vậy, dưới đây chúng ta cũng sẽ đề cập tới những tiến bộ đạt được trong việc xác định các thành phần này cũng như các chiến lược cần phải phát triển để tạo nên các NST nền tảng cho các vec tơ MAC.

3.2 Sự cần thiết phải kiến tạo một NST nhân tạo

Có rất nhiều lý do mong muốn xây dựng một NST nhân tạo động vật có vú (MAC). Trước tiên là cần phải tạo được một hệ thống thí nghiệm để khám phá sự tổ chức và cơ chế của NST động vật trong gián phân. Tuy nhiên, khi đưa MAC vào chuột chuyển gen thì nó đòi hỏi phải là DNA chức năng của MAC và phải có tính ổn định trong thời gian phân bào giảm nhiễm. Công việc khẩn yếu của chúng ta là phải sửa chữa và tái tổ hợp NST một cách chính xác. Ngoài các nghiên cứu về cách vận hành NST thì NST nhân tạo động vật có vú phải được phân tích chức năng gen, các lớp gen và các vùng của hệ gen vô cùng lớn để xử lý được dễ dàng trong các hệ thống vec tơ hiện hành. Chẳng hạn như, chúng phải được phân tích về những yếu tố điều hòa xa trong sự biểu hiện gen và phải phân tích trình tự bất hoạt của NST và in (imprinting) hệ gen. Lợi thế của cách tiếp cận MAC vượt hẳn NST nhân tạo nấm men (yeast artificial chromosome – YAC) là nó không có hiệu ứng về vị trí và các gen đột biến được cài vào từ sự hợp nhất của các phân tử DNA lớn vào trong hệ gen vật chủ.

Về mặt thực tiễn, MAC có thể tạo tiềm năng cho sự lựa chọn các cách tiếp cận cơ sở virus để hiệu chỉnh các bệnh di truyền bằng GTL soma. Lợi thế chính của các vec tơ MAC cho GTL là nó nới rộng thêm các giới hạn về kích cỡ của DNA được cài vào, có thể đạt tới mức mười triệu cặp base (kích thước của NST người nguyên bản từ 45 megabasepairs [Mbps] đến 250 Mbps). Việc điều hòa gen bình thường luôn phụ thuộc vào các yếu tố điều hòa có nhiều intron lớn tới 10, thậm chí 100 kilobase (kb). Vì thế, trong nhiều trường hợp các yếu tố này không có đầy đủ khả năng đưa gen vào hệ gen đảm bảo chính xác cũng như biểu hiện gen một cách đầy đủ. Đây là vấn đề cực kỳ quan trọng với GTL vì mục tiêu của nó là tái tạo lại chức năng gen nguyên bản mà sự biểu hiện đặc hiệu mô, sự kiểm soát thời gian một cách thích hợp và liều lượng chuẩn xác là những yếu tố cơ bản trong sự vận hành của gen. Ngoài ra, các MAC lớn còn mang một nhóm gen đầy đủ sẽ tạo được tiềm năng cho việc hiệu chỉnh hội chứng loại trừ gen kề nhau (contiguous gene-deletion syndrome), hội chứng này có liên quan tới sự khiếm khuyết của hơn một gen. Để ứng dụng được, cần đòi hỏi một DNA lớn được đưa vào và tồn tại mãi bên cạnh tế bào ở trạng thái NST phụ (để tránh gây đột biến các gen cài) với sự rủi ro nhỏ nhất về các phản ứng miễn dịch không mong muốn kháng lại protein ngoại lai của MAC ở các vec tơ.

3.3 Nhiễm sắc thể nhân tạo động vật có vú (MAC) lý tưởng

Nhiễm sắc thể của tế bào nhân chuẩn đơn giản nhất cũng phải có tâm động (centromere), các gốc sao chép, và 2 khúc cuối (telomere). Những cấu trúc này đủ để tạo nên một NST nhân tạo của nấm men YAC (Hahnenberger và cộng sự., 1989; Murray và Szostak, 1983). Các bản phiên mã của động vật có xương sống liệu đã đủ để tạo được một NST nhân tạo (MAC) hay chưa? điều này vẫn chưa được rõ. Chúng ta có thể hiểu rằng, trong hệ thống động vật có xương sống vẫn còn đòi hỏi phải có các yếu tố khác nữa. Chẳng hạn như theo những số liệu hiện tại thu được càng nhiều đã chứng minh rằng các tương tác NST-vi ống kiểm soát vị trí và sự di động của NST chẳng những làm giới hạn tâm động mà còn phân bố nó dọc theo cánh tay NST (Afshar và cộng sự., 1995; Murphy và Karpen, 1995; Vernos và cộng sự., 1995). Ngoài ra, chất nhiễm sắc của tế bào nhân chuẩn cao hơn ở vùng trung tâm có thể có chức năng sinh học rất quan trọng trong việc đảm bảo cho sự phân ly thật chính xác (Barton và Goldstein, 1996; Dernburg và cộng sự., 1996).

Nếu chúng ta có ý định muốn tạo nên một MAC lý tưởng thì các đặc trưng của chúng là gì? Các NST động vật có xương sống nguyên bản là các phức hợp nucleoprotein không lớn lắm, nhưng lại mang tới hàng nghìn gen. Để phù hợp với thực tiễn thì MAC cần phải gọn nhỏ hơn. Khi thao tác *in vitro* với chiều dài hàng vài triệu base thì phần hữu dụng của một vec tơ MAC chỉ dưới vài trăm kilobasepair (kbp).

Đối với vấn đề này, để đạt được lợi ích tối đa người ta có thể đưa thêm DNA cần thiết vào với bất kỳ kích cỡ nào. Như vậy, một NST nhân tạo động vật có vú (MAC) ổn định về phân bào và có kích cỡ chừng vài trăm kbp thì mới phù hợp với một gen lớn như locus dystrophy của bệnh đau cơ Ducchenne 2400 kbp (Heus và cộng sự., 1996) hoặc phải mang đoạn NST có chiều dài hàng 10 triệu cặp base.

Tính ổn định phân bào ở đây có nghĩa là NST được truyền lại cho các tế bào con cháu phải khỏe khoắn như là NST nguyên bản với xu hướng được sắp xếp lại (như sự chuyển vị, sự loại bỏ hay đảo ngược) xảy ra ở tần số không lớn hơn NST nguyên bản. Những đảo ngược dù nhỏ của MAC cũng không được hợp nhất vào các NST nguyên bản lớn hơn ở bất kỳ tỷ lệ thích ứng nào.

MAC lý tưởng sẽ “che mắt” được hệ miễn dịch, nó không mang bất kỳ kháng nguyên nào được mã bởi virus hoặc bất kỳ protein ngoại lai nào kích thích hệ miễn dịch. Theo lý thuyết, một MAC được kiến tạo từ các thành phần di truyền của người thì ngoài các thành phần được mã trong DNA cài vào, không có các thành phần khác có thể tạo cơ sở cho các phản ứng miễn dịch.

Đặc trưng cuối cùng cần phải quan tâm ở đây là những nghi vấn về công nghệ của MAC. Tức là MAC phải được chuyển giao tới các quần thể tế bào đích, cả dạng phổ thông cũng như các dạng đặc biệt. Việc chuyển giao DNA hiện nay là một quá trình rất kém hiệu lực. Trái lại MAC lại giữ vai trò rất quan trọng trong quá trình chuyển giao tuy nó là sự vận chuyển thụ động bởi các tác nhân khác có cơ sở virus hoặc hóa học. Khó khăn lớn nhất cần phải vượt qua là làm thế nào để chuyển được những phân tử DNA lớn tới tế bào một cách nguyên vẹn. Các phương pháp cô đặc và đóng gói các phân tử DNA lớn vào trong các cấu trúc phải được quản lý một cách dễ dàng, chắc chắn nhưng có thể đảo ngược lại được, đó là các vấn đề quan trọng cần phải nghiên cứu. Hơn nữa, khi màng tế bào bị phá vỡ thì việc vận chuyển hiệu quả DNA tới nhân lại là một quá trình khác, đó cũng là một vấn đề cần phải nghiên cứu.

3.4 Các chiến lược tạo NST nhân tạo ĐVCV (MAC)

Một câu hỏi đặt ra là còn bao xa nữa thì chúng ta sẽ tạo được một NSTNTĐVCV (MAC) ? Mặc dù chưa thật sự có MAC, nhưng đã có những tiến bộ đạt được trong việc tạo ra các đặc tính của nhiều yếu tố chức năng. Những tiến bộ này đạt được cả trong thao tác các NST người đang tồn tại (gọi là các tiếp cận từ trên xuống: Top-down) và cả việc lắp ráp các thành phần khác nhau (cách tiếp cận từ dưới lên: Bottom-up).

3.4.1 Cách tiếp cận từ trên xuống (top-down)

Sự phân cắt bằng cảm ứng bức xạ tạo ra các NST nhỏ đã được sử dụng để nghiên cứu những yêu cầu về DNA với chức năng của tâm động trong nấm men và ruồi giấm (Murphy và Karpen, 1995; Niwa và cộng sự., 1986; Sun và cộng sự., 1997). NST tế bào động vật có vú được cắt nhỏ bằng cảm ứng và các NST bị cắt xén sẽ được hồi phục lại về dạng bán trật tự (semi-orderly) thông qua việc đưa vào các đoạn ngắn trình tự lặp (TTAGGG)_n của telomere động vật có xương sống (Barnett và cộng sự., 1993; Farr và cộng sự., 1991; Hanish và cộng sự., 1994). DNA telomere vì thế có thể được sử dụng như một công cụ giải phẫu NST ĐVCV và công việc ở đây là tập trung vào việc phân lập DNA tâm động người trên các NST nhỏ đang sao chép. Lợi thế của cách tiếp cận này là không đòi hỏi trước tiên phải am hiểu kỹ lưỡng cấu trúc của NST ĐVCV và tránh được các yếu tố của NSTĐVCV vẫn còn chức năng khi được đưa vào các ĐVCV như DNA trần hay chất nhiễm sắc của nấm men. Bất lợi chính là thao tác NST trong các ĐVCV là kém hiệu quả. Một giới hạn nữa là những hậu quả của việc tạo nên các cấu trúc không ổn định trong phân bào có thể không được tái hồi phục.

Nhìn chung, chiến lược này là việc thao tác một NST không thiết yếu vẫn tồn tại trong lai tạo tế bào soma thông qua việc sử dụng DNA telomere đã phân dòng cùng với các thành phần hóa sinh để phân lập các yếu tố có liên quan tới NST nghiên cứu.

Năm 1992 Farr và cộng sự đã mô tả việc tạo ra dòng tế bào nguyên bào sợi chuột bạch Trung Hoa mang phiên bản đã cắt xén của NST người, trong đó toàn bộ cánh tay dài đã được loại bỏ. Nhiễm sắc thể này được thiết lập bằng cách hợp nhất cấu trúc telomere vào trong vệ tinh alpha (alpha satellite array) và telomere mới được nuôi dưỡng ở đây. Để làm ổn định sự hợp nhất phải loại mất 750 kbp DNA vệ tinh alpha, rõ ràng là đã loại đi khoảng ~ 2.5 Mbp có chức năng phân bào. Điều này phù hợp với sự mô tả rằng thể biến dị nảy sinh một cách tự nhiên muốn có sự ổn định về mặt phân bào phải loại đi rất nhiều DNA vệ tinh alpha (Wevrick và cộng sự., 1990). Tuy nhiên không thấy điều hòa xuống sự biểu hiện gen thông qua hiệu ứng vị trí (Bayne và cộng sự., 1994). Điều này chứng minh rằng sự gắn gũi vật lý của các dấu chuẩn chọn lọc ngoại sinh (exogenous selectable marker) và sự cần thiết của các yếu tố NST chức năng không phải là một đặc trưng cho sự giới hạn của hệ thống. Vậy các gen và promoter khác có áp dụng giống như thế hay không thì còn phải xem xét sau. Mới gần đây, một NST tương tự đã được ráp nối thành một NST của người dạng thẳng và nhỏ, kích cỡ < 10 Mbp, trong đó tâm động được xếp dọc sườn 2 cấu trúc telomere đã được cài vào. Nhiễm sắc thể nhỏ này ổn định về phân bào vì toàn bộ nhiễm sắc thể X đã được chuyển vào (Far và cộng sự., 1995). Một phiên bản cải tiến của của chiến lược này đã được sử dụng để cắt cả cánh tay ngắn và cánh tay dài nhiễm sắc thể Y của người nhờ sự hướng đích của DNA telomere tới DNA vệ tinh alpha ở tâm động nhiễm sắc thể Y (Brown và cộng sự., 1994).

Rất nhiều thông tin về trình tự của tâm động người thu thập được từ những phân tích về sự nảy sinh tự nhiên của nhiễm sắc thể Y đã được sắp xếp lại. Rõ ràng là, những trình tự cần thiết cho chức năng của tâm động Y có thể định vị ở khu vực chứa khoảng ~ 200 kbp vệ tinh alpha và 300 kbp trình tự cánh tay ngắn giáp ranh (Tyler-Smith và cộng sự., 1993) – một kết luận được rút ra từ sự giải phẫu tâm động Y. Các nghiên cứu trên các tế bào nhân chuẩn khác (*Schizosaccharomyces pombe* và *Drosophila melanogaster*) cũng chứng minh rằng cần phải có các trình tự DNA nằm bên sườn các NST nhỏ để phân ly phân bào hoàn toàn (Braun và cộng sự., 1994; Murphy và Karpen, 1995). Mới gần đây, nhóm nghiên cứu thuộc Đại học Oxford đã thao tác nhiễm sắc thể Y có kích cỡ khoảng 9 Mbp – 3 Mbp. Các nhiễm sắc thể nhỏ hơn từ Yq và DNA vệ tinh alpha của chúng đã được sắp xếp lại rất nhiều. Một nhiễm sắc thể nhỏ chừng 4 Mbp thể hiện ổn định về mặt phân bào trong vài tháng ở các tế bào CHO, trong khi đó một NST nhỏ hơn (2,5 Mbp) lại có những tín hiệu cho thấy không được ổn định (Brown và cộng sự., 1996; Heller và cộng sự., 1996). Khi đưa các tế bào gốc phôi chuột vào các NST nhỏ của người (từ 4-15 Mbp) thì thấy có sự sắp xếp lại hoặc phân ly lộn xộn và nó sẽ mất đi một cách không chọn lọc (Shen và cộng sự., 1997; Loupart và cộng sự., 1988). Lý do sự phân ly nghèo nàn này vẫn chưa rõ, nhưng có khả năng là trong các dòng tế bào thiết lập thì việc kiểm soát chức năng của tâm động dễ hơn và sự phân ly NST cũng cao hơn các tế bào phôi. Rõ ràng là tính ổn định về phân bào của bất kỳ NST nào trong các tế bào sơ cấp bình thường cũng khác với các dòng tế bào được thiết lập bằng nuôi cấy mô, đó là một khía cạnh đặc biệt cần phải lưu ý. Hiện nay các nhà di truyền học ĐVCV đang nghiên cứu cách vận hành của NST trong các tế bào sống. Tuy nhiên vẫn còn phải đầu tư nhiều thời gian nữa mới đi đến những kết quả đột phá.

Một phương pháp thu tóm được các khía cạnh hạn chế của thao tác NST trong các dòng tế bào ĐVCV thiết lập đó là việc sử dụng virus gây bệnh bạch cầu của chim (avian leukosis virus – ALV) để cảm ứng dòng tế bào DT40 u lympho tế bào B. DT40 khác với các tế bào ĐVCXS là nó biểu lộ rất cao tái tổ hợp tương đồng (Buerstedde và Takeda, 1991). Hiện

ứng đích ở DT40 đạt 10- 100% và cao hơn các tế bào ĐVCV. Bằng việc chuyển NST ĐVCV vào trong DT40 người ta có thể thao tác được hệ thống đích (Dieken và Fournier, 1996; Dieken và cộng sự., 1996). Khi phân đoạn NST đích người ta đã được một NST nhỏ cơ sở nhiễm sắc thể X của người ~2,5 Mbp, ổn định trong các tế bào DT40 trong vài tháng (Mills và cộng sự., 1999). Các NST nhỏ sau đó có thể được đưa trở lại các dòng tế bào ĐVCV để kiểm tra hiệu ứng của các cải biến đối với tính ổn định phân bào. Áp dụng chiến lược này, người ta có thể cải tiến xa nữa các NST nhỏ trong DT40 mà không cần phải lắp ráp thêm một MAC từ các cấu trúc đã phân dòng.

Dựa trên các nhận thức từ các dòng tương tự, một nhóm nghiên cứu đã xác định được các NST dot nảy sinh một cách tự nhiên có thể là cơ sở cho các thao tác xa hơn. Mặc dầu một số dấu chuẩn NST đã được mô tả trong các tài liệu, nhưng việc phân tích chúng thường không phải ở mức di truyền tế bào, với các thông tin thiếu xác thực về tính ổn định phân bào và kích thước của các cấu trúc cũng chưa chính xác. Gần đây, một nhóm các nhà nghiên cứu Italia đã mô tả một dấu chuẩn từ NST 9 của người. Nhiễm sắc thể này đã được vận chuyển bằng MMCT vào một dòng tế bào loài gặm nhấm. Nhiễm sắc thể này được xác định có kích cỡ 5-10Mbp (Raimondi và cộng sự., 1995). Những khó khăn chính của cách tiếp cận này là, thứ nhất – cần phải xác định được nguồn gốc các trình tự DNA có mặt ở dấu chuẩn mà thực tế nó có thể đã trải qua nhiều lần sắp xếp lại trong quá trình tiến hóa. Thứ hai là cần phải xác định được kích cỡ và bản chất của NST (dạng thẳng hay dạng vòng...)

3.4.2 Cách tiếp cận từ dưới lên (bottom-up)

Cách tiếp cận từ dưới lên dùng để thiết kế YAC vì yếu tố này đảm nhiệm một chức năng đặc biệt mà người ta đã biết rõ và đã phân lập được (Hahnenberger và cộng sự., 1989; Muray và Szostak, 1983). Tuy nhiên, ở ĐVCV thì cho tới nay chỉ có tâm động mới xác định được ở mức DNA. Người ta có thể đặt một đoạn ngắn (khoảng vài trăm cặp base) các đoạn lặp [TTAGGG]_n của tâm động ĐVCXS vào trong vec tơ, chúng sẽ “gieo” thông tin cho các NST mới và cuối cùng là đưa nó vào các dòng tế bào thiết lập (Barnett và cộng sự., 1993; Farr và cộng sự., 1991; Hanish và cộng sự., 1994; Tay lor và cộng sự., 1994). Vậy như thế đã đủ để tạo được chức năng của tâm động trong các tế bào sơ cấp hay chưa? Điều đó vẫn còn phải kiểm định lại.

Mặc dầu có vẻ như là các gốc sao chép (origin of replication) thường phân bố dọc theo NST (mỗi gốc chừng 50-300 kbp). Những đòi hỏi về trình tự chính xác của DNA các gốc sao chép ĐVCV (nếu tồn tại), hoặc ở thời điểm như thế nào thì sự khởi đầu sao chép DNA sẽ bị ảnh hưởng bởi các locus của NST bên cạnh, tất cả những cái đó đều chưa xác định được một cách rõ ràng. Và cũng giống như bất kỳ đoạn DNA nào của ĐVCV với kích cỡ > 100kbp thì cũng có khả năng sao chép được trong NST (Calos, 1996; Coverley và Laskey, 1994; Tyler-Smith và Willard, 1993).

Chứng ngại lớn hơn là chúng ta chưa hiểu đầy đủ về cách bài trí của một tâm động ĐVCV loại nhỏ. Ứng cử viên sáng giá nhất cho vấn đề này là trình tự DNA giữ vai trò quan trọng cho chức năng tâm động người – đó là DNA vệ tinh alpha có ở thất sơ cấp (primary constriction) tất cả NST người bình thường. Lượng DNA vệ tinh alpha ở vùng tâm động thay đổi rất lớn (từ 300 kbp trên một số nhiễm sắc thể Y đến nhiều Mbp ở các NST thường) (Tyler- Smith và Willard, 1993; Willard, 1990). Sự sắp xếp lại mảng vệ tinh alpha cho thấy số lượng DNA đòi hỏi cho một tâm động chức năng loại nhỏ trên thực tế là

tương đối ít. Chẳng hạn như, một NST nhỏ từ nhiễm sắc thể Y của người đã được tạo ra bằng thực nghiệm chỉ có 140 kbp DNA vệ tinh alpha (Brown và cộng sự., 1994; Heller và cộng sự., 1996). Một cách tiếp cận khác về tâm động là thâm chuyển DNA vệ tinh alpha vào trong các dòng tế bào ĐVCV thiết lập như các tế bào CHO, các tế bào HT1080 của người và các tế bào L của chuột (Haaf và cộng sự., 1992; Larin và cộng sự., 1994; Taylor và cộng sự., 1996). Có rất nhiều quan sát đã được báo cáo trong đó có cả các báo cáo về những yếu tố NST phụ không ổn định, tính không ổn định của NST, cấu trúc bậc hai, sự gắn kết kháng huyết thanh CREST và các cầu nối hậu kỳ (anapha). Điều đó chứng minh rằng DNA alphoid có khả năng bắt chước được ít nhất là một số đặc tính của tâm động người, nhưng chưa thực hiện được việc tạo chức năng cho cả tâm động. Tuy nhiên, mới gần đây 2 nhóm nghiên cứu đã mô tả việc kiến tạo các NST nhỏ *de novo* ổn định với tần số thấp trong các tế bào nuôi cấy mô (Harrington và cộng sự., 1997; Ikeno và cộng sự., 1998). Trong báo cáo thứ nhất, một đoạn DNA tổng hợp của vệ tinh alpha phân dòng từ BAC (có ở NST số 17 của người hoặc tâm động của nhiễm sắc thể Y) đã được gắn với DNA đoạn lặp của tâm động cùng với bộ phận chuyên chở gen và được thâm chuyển bằng liposome (lipofected) (không có bước gắn trước) vào trong các tế bào HT1080 của người. Điều này dẫn đến việc tạo được một số ít NST nhỏ, thẳng 6-10 Mbp, phân ly tốt và tồn tại ở dạng bản phiên mã đơn (single copy). Những phân tích chi tiết về di truyền tế bào sau này đã vạch rõ rằng trong hầu hết các trường hợp, những NST nhỏ này đều được tạo bởi DNA có nguồn gốc từ hệ gen người nhận cùng với các trình tự thâm chuyển (thường thông qua sự cắt xén trung gian tâm động). Tuy nhiên, có một trường hợp NST nhỏ này lại không chứa DNA alphoid nào ngoài DNA đã được đưa vào trong hỗn hợp thâm chuyển, điều đó chứng tỏ rằng nó có thể được tạo ra *de novo*. Trong báo cáo thứ hai, các YAC mang DNA vệ tinh alpha từ nhiễm sắc thể 21 của người đã được làm tái thích hợp với các đoạn lặp của tâm động ĐVCXS và dấu chuẩn chọn lọc kháng blasticidin. DNA của YAC được làm tinh khiết bằng điện di xung điện trên gel và được thâm nhiễm bằng liposome (lipofected) hoặc vi tiêm vào các tế bào HT 1080. Đã quan sát thấy một số NST nhỏ thâm chuyển (transfectant). Những NST nhỏ này có kích cỡ vài Mbp, và rõ ràng bao gồm các multimer của YAC, nhưng có cấu trúc thẳng hay vòng thì vẫn chưa rõ. Mới gần đây, dựa trên cách tiếp cận YAC để tạo NST nhân tạo người cũng đã được lặp lại bởi các tác giả khác (Hunning và cộng sự., 1999). Với các thí nghiệm này đã chứng minh một cách chắc chắn rằng DNA vệ tinh alpha đã tạo được chức năng tâm động phân bào trong các tế bào người. Tuy nhiên, tần số các dữ kiện còn thấp và vẫn còn rất nhiều khó khăn trong việc xác định đầy đủ các thành phần của NST nhỏ, tức là vai trò của DNA vệ tinh alpha và những đòi hỏi cho một MAC. Tất cả những vấn đề đó cần phải được sáng tỏ hơn nữa.

Cách tiếp cận khác là phát hiện các tâm động ĐVCV loại nhỏ mà đi tiên phong là Vos và cộng sự. Các nhà khoa học đã tận dụng khả năng của virus Epstein-Barr (EBV) mã cho protein EBNA-1 để tương tác với trình tự *oriP* cùng nguồn gốc nhằm giữ các DNA đã được gắn trong nhân tế bào ĐVCV. Sau khi đã thiết lập được các vòng lớn nó sẽ gắn vào *oriP* (kích thước 100-300 kbp) và duy trì ổn định các episome này trong các tế bào biểu hiện EBNA-1 (Sun và cộng sự., 1994). Mới gần đây người ta đã thông báo rằng phần được cài vào người có chứa YAC được làm tái thích với trình tự *oriP* đã cho phép nó duy trì được trong các dòng tế bào thích ứng (Simpson và cộng sự., 1996). Theo lý thuyết, ta có thể thiết lập được một thư viện các đoạn hệ gen để làm giàu DNA vệ tinh alpha và

có thể kiểm tra chức năng của tâm động sau khi đã loại bỏ EBNA-1 bằng recombinase đặc hiệu vị trí (Klby và cộng sự., 1993).

Thật hấp dẫn là một số NST có dấu chuẩn của người đã được thông báo là tương đối ổn định về phân bào khi thiếu DNA vệ tinh alpha. Nhưng sự kiện hiếm gặp này có thể do sự hoạt hóa tự phát các vùng ở cánh tay NST mà tạo được chức năng cho tâm động chứ không có bất kỳ thay đổi nào ở mức trình tự DNA (Choo, 1977; du Start và cộng sự., 1997). Bằng chứng về ảnh hưởng biểu sinh (epigenetic) đối với tính ổn định của tâm động nảy sinh từ các nghiên cứu trên nấm men *S. pome* (Steiner và Clarke., 1994) và ruồi giấm (Williams và cộng sự., 1998).

3.5 Các vấn đề thực tiễn và tồn tại

Mối quan tâm nhất đối với bất kỳ cách tiếp cận nào trong việc tạo ra các NSTNTĐVCV (MAC) là liệu có thể tạo được một NST ổn định chỉ gồm domain tâm động chức năng và các gốc sao chép nằm bên sườn các tâm động mới được tạo ra? Mật độ không gian của các yếu tố NST trong một cấu trúc nhỏ như vậy có thể sẽ ảnh hưởng tới chức năng của NST. Tuy nhiên, phần DNA không ở các cánh tay NST có cần thiết cho các tương tác bình thường của con thoi và hiệu chỉnh sự phân ly của NST hay không thì vẫn chưa rõ. Như đã đề cập ở trên, các bằng chứng gần đây đã chứng minh rằng các protein vận động được sắp xếp dọc theo chiều dài các cánh tay NST có thể có liên quan tới sự ổn định của con thoi lưỡng cực (biopolar spindle), sự sắp đặt vị trí đặc hiệu và sự phân ly của NST. Nếu sự hiện diện của các cánh tay NST là khẩn yếu cho sự ổn định thì có thể khẳng định rằng các NST ĐVCV dạng thẳng là có kích thước nhỏ nhất. Trong các nghiên cứu trước đây trên YAC người ta đã phát hiện rằng tính ổn định và sự phân ly của NST phụ thuộc rất nhiều vào kích cỡ NST và các YAC nhỏ hơn 100 kbp vẫn chưa có tính ổn định cao (NST bình thường của *S. cerevisiae* có kích cỡ từ 245 kbp đến 2,2 Mbp) (Murray và cộng sự., 1986). Kết hợp các cách tiếp cận từ trên xuống và từ dưới lên sẽ cho phép xác định được kích cỡ nhỏ nhất của một NST ĐVCV dạng thẳng ổn định phân bào (Brown và cộng sự., 1996; Heller và cộng sự., 1996; Masumoto và cộng sự., 1998; Mills và cộng sự., 1999).

Một vec tơ MAC cơ bản phải vượt qua hai thử thách lớn trước khi được dùng trong GTL soma: Thứ nhất, MAC được sản xuất phải đủ chất lượng cho mục đích trị liệu, thứ hai là phải chuyển được tới tế bào. Như chúng ta biết, các đoạn DNA lớn rất khó điều khiển và chuyển giao ở trạng thái nguyên vẹn. Tất cả các tế bào đều phải dùng polyethylene glycol để đưa các phân tử YAC lớn, nguyên vẹn vào trong các tế bào nuôi cấy. Tuy nhiên cũng chỉ có thể áp dụng được với một vài dòng tế bào của loài gặm nhấm và nó cũng không thích hợp cho sự chuyển giao MAC *in vivo* (Huxley và cộng sự., 1991; Larin và cộng sự., 1994). Việc chuyển NST qua trung gian vi thể bào có thể được sử dụng cho nhiều dạng tế bào ĐVCV, nhưng nói chung ít hiệu quả và cũng chỉ mới được ứng dụng *in vitro*. Sự đóng gói DNA của virus cũng chỉ được giới hạn với các DNA có chiều dài vài trăm kbp thì mới có thể chuyển giao được. Một số phương pháp khác hiện có lại chưa thiết lập được giới hạn trên (upper size limit), chẳng hạn như sự chuyển giao bằng đánh bom các hạt (Cheng và cộng sự., 1993), các lipid cationic và sự hấp thu qua trung gian receptor (Crisrtiano và cộng sự., 1993; Curiel. 1994; Gao và cộng sự., 1993). Một lipid cationic như lipofectin đã được dùng để chuyển giao ít nhất vài trăm kbp DNA nguyên vẹn tới các tế bào trong nuôi cấy mô, nó ít gây độc tế bào và dường như có mặt trong hầu hết các hệ thống

chuyển giao được áp dụng *in vitro* và *in vivo* (Caplar và cộng sự., 1995; Strauss và cộng sự., 1993; Stribbing và cộng sự., 1992; Zhu và cộng sự., 1993). Một khía cạnh phức tạp khác là với sự có mặt của lipid cationic thì không rõ MAC sẽ được chuyển giao như là một chất nhiễm sắc (chromatin) hay là được cô lập như một DNA trần. Một thách thức nữa là chất lượng của MAC được tạo ra. Mặc dầu một số dấu chuẩn chọn lọc có thể cho phép chọn lọc được nhiều bản phiên mã tế bào thông qua việc ứng dụng các thuốc khuếch đại đặc hiệu (như locus dhfr và sự chọn lọc methotrexate). Nhưng vẫn còn khó khăn là phải tưởng tượng như thế nào về sự hiện diện của các yếu tố hay các vấn đề về giới hạn của chất liệu cũng như sự thiếu hiệu quả của các phương pháp chuyển giao... khi tiến hành thiết lập MAC. Không nghi ngờ gì nữa, các vấn đề này đòi hỏi phải có nền công nghệ hiện đại và những đột phá về nhận thức trước khi nghĩ tới việc ứng dụng MAC trong gen trị liệu soma.

3.6 Kết luận

Nhiễm sắc thể nhân tạo động vật có vú có nhiều chức năng khác nhau. Không phải là các phiên bản phân dòng hay được tổng hợp nhân tạo mà chỉ các gen có dấu chuẩn thiết yếu mới được đưa vào như một bộ phận của vec tơ. Điều lý thú là liệu các cấu trúc này được tạo ra theo cách “cắt- dán” như khi ta tạo NST nhân tạo của nấm men hay là với các thao tác phức tạp cải biến các NST nhỏ trong hệ thống tế bào ĐVCXS ? Cả hai cách tiếp cận này đều giúp chúng ta hiểu sâu hơn nữa về cấu trúc của NSTNTĐVCV và mối quan với chức năng của nó.

Tuy nhiên, tất cả vẫn còn ở phía trước và cần phải đầu tư nhiều thời gian và công sức cho lĩnh vực khoa học hấp dẫn và đầy tính thực dụng này.

Chương IV

CÁC VEC TƠ RETROVIRUS

4.1. Mở đầu

Virus là các ký sinh bắt buộc, chúng không tự sao chép được nếu không có sự trợ giúp của các tế bào vật chủ. Vì thế, một cách tự nhiên nó thích nghi với việc vận chuyển hiệu quả các thông tin di truyền tới các tế bào. Một số virus đã có những chiến lược khác nhau về tiến hóa để cho phép chúng đi vào được các tế bào và thông tin di truyền của chúng cũng được chuyển đi với một phạm vi nào đó. Chính vì cơ chế này mà virus có thể được sao chép và sản xuất ra các hạt virus mới hay là các virion.

Về khía cạnh này, retrovirus được đặc biệt quan tâm bởi vì mặc dù chúng mang hệ gen RNA, nhưng hệ gen này lại đòi hỏi phải được phiên thành dạng DNA sợi kép trong các tế bào bị nhiễm, sau đó nó có thể hợp nhất được trong DNA tế bào vật chủ. Khi DNA virus đã được hợp nhất tức là các provirus thì việc sao chép cũng xảy ra giống như các gen khác của tế bào và RNA đặc hiệu virus được sử dụng để tạo ra các protein virus và RNA

hệ gen mới, và như thế tức là các virion mới được tạo thành. Các provirus hợp nhất là một bộ phận ổn định của hệ gen tế bào, nó quyết định sự sống của tế bào và có thể di truyền lại cho các thế hệ sau. Đặc tính thứ 2 này của retrovirus biến nó trở thành một ứng cử viên lý tưởng cho việc vận chuyển gen. Nó chính là một hệ thống vec tơ có khả năng biểu hiện gen dài hạn (long-term gene expression).

Hơn nữa, trên 40 năm nay người ta đã hiểu rõ các đặc tính “vec tơ thân thiện” (vector friendly) của retrovirus qua các nghiên cứu so sánh với các virus khác. Các đặc tính sinh học của các virus này cũng như sự tương tác của chúng với các tế bào vật chủ cũng được hiểu rất rõ.

Người ta đã nhận ra rất sớm rằng những virus này có thể vận chuyển được các gen tế bào (Stehelin và cộng sự., 1976) và nó là một hệ thống vec tơ virus đầu tiên đã được sử dụng. Mặc dù hệ thống vec tơ này rất đơn giản, chỉ là một dạng virus hoang dã được dùng để chuyển hệ gen tái tổ hợp có mang dấu chuẩn gen (Shimotohno và Temin, 1982; Tabin và cộng sự., 1982). Các hệ thống này đã được nâng cấp và cuối cùng đã tạo được một vec tơ hoàn thiện.

Trước khi thảo luận về hệ thống vec tơ này chúng ta hãy lướt qua đôi nét về chu kỳ sao chép của retrovirus cũng như các khía cạnh về vec tơ retrovirus như thế nào.

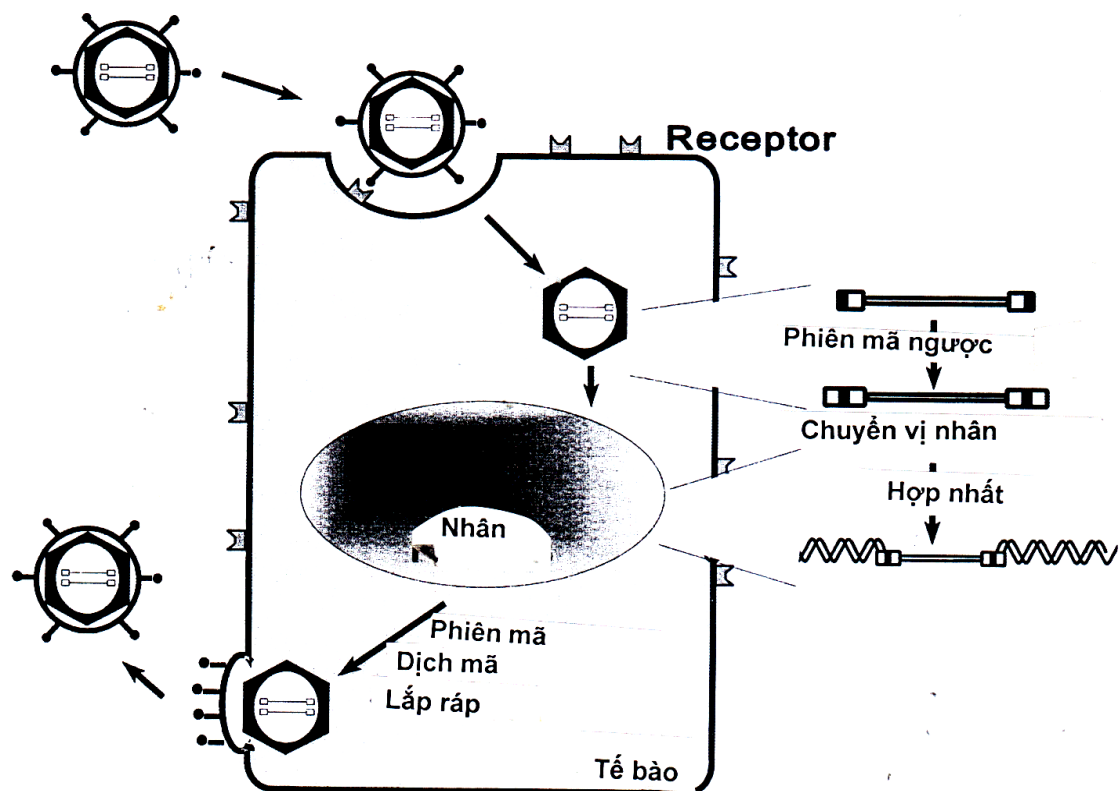
4.2. Chu kỳ (vòng) sao chép của retrovirus

Chu kỳ sống của retrovirus được tóm tắt trong Hình 4.1

4.2.1 Những dữ kiện kinh điển

Retrovirus là các hạt virus có vỏ bọc mang 2 bản phiên mã đồng nhất của hệ gen RNA chuỗi đơn (Varmus và Brown, 1989). Phần protein lớp vỏ ngoài cùng của virus (protein bề mặt hay là protein SU) gắn đặc hiệu với các receptor ở màng tương bào tế bào đích, làm cho virus thâm nhập được vào tế bào (Hình 4.1). Sau khi lột bỏ lớp vỏ chỉ còn lại phần capsid phía bên trong thì RNA hệ gen virus ở capsid chuyển thành dạng DNA chuỗi kép nhờ enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase-RT) gắn với capsid. Quá trình này khởi đầu bằng việc sử dụng chất mồi tRNA có trong capsid gắn đặc hiệu với RNA hệ gen retrovirus. Khi sao chép ngược, các trình tự độc quyền ở các đuôi của RNA hệ gen virus được nhân đôi và cả 2 đuôi đều là DNA được tổng hợp mới, vì thế tạo nên một trình tự lặp tương đối dài ở các đuôi của phân tử DNA vì thế có tên là đoạn lặp tận dài (long terminal repeat - LTR). Bản phiên mã DNA chuỗi kép này đặt cạnh các LTR, sau đó được chuyển vị để vào bên trong nhân (Hình 4.1).

4.2.2 Sự hợp nhất của DNA virus vào trong DNA hệ gen tế bào chủ



Hình 4.1 Chu kỳ sao chép của retrovirus. Retrovirus là các virus có vỏ bọc mang 2 bản phiên mã đồng nhất của RNA hệ gen. Để gây nhiễm cho tế bào, protein SU vỏ virus tương tác với tế bào mã cho receptor bọc lộ trên bề mặt tế bào. Sự tương tác này dẫn đến sự “hòa nhập” của các hạt virus và làm mất đi lớp vỏ do sự hòa màng. RNA hệ gen virus được sử dụng như một khuôn sản xuất ra phân tử DNA chuỗi kép nhờ enzyme phiên mã ngược có ở phần lõi (hình phía trên). Trong quá trình này, các trình tự ở các đuôi của hệ gen virus được nhân đôi và định vị. Phức hợp này sau đó định vị vào nhân, ở đó phân tử DNA chuỗi kép được cài vào DNA hệ gen tế bào vật chủ nhờ enzyme integrase (hình phía dưới). Dạng DNA hợp nhất của hệ gen virus chính là provirus, sau này nó cũng sao chép giống như bất kỳ gen nào của tế bào nhờ cơ chế phiên mã của tế bào chủ với promoter virus. RNA virus được phiên mã mới dùng để tổng hợp protein cho các virus mới cũng như RNA hệ gen của các hạt virus. Protein virus và RNA được lắp ráp trong phần lõi hoặc capsid mới, nó tương tác với màng tế bào vật chủ nơi có chứa các protein vỏ virus mới được tổng hợp và tạo mới các hạt virus rồi ra khỏi tế bào nhiễm, trải qua giai đoạn cuối cùng của sự đột biến để tạo nên dạng đầy đủ của hạt virus thâm nhiễm. (Theo Walter H. Gunzburg và Brian Salmons. Gene Therapy Technologies, Applications and regulations. John Wiley & Sons Ltd 1999).

Sau khi tới nhân, dạng DNA chuỗi kép được hợp nhất với DNA nhiễm sắc thể tế bào vật chủ bởi enzyme integrase (IN) gắn virus (Hình 4.1). Dạng DNA hợp nhất này có tên là provirus. Sự hợp nhất của provirus là sự cần thiết ngẫu nhiên đối với DNA nhiễm sắc thể tế bào chủ mặc dù có thể có sự thiên lệch nào đó ở những vùng có sự sao chép tích cực. Có 2 đặc trưng chính của sự hợp nhất retrovirus thích hợp cho gen trị liệu. Thứ nhất, provirus luôn được thấy như là các DNA đồng tuyến tính với các gen cấu trúc LTR-gen retrovirus- LTR (structure LTR-retrovirus genes-LTR). Điều này rất trái ngược với các DNA hợp nhất khác do sự thâm nhiễm với các virus khác hoặc do sự truyền DNA trần mà ở đó

DNA đã được vận chuyển ở dạng hoán vị. Thứ hai, provirus được di truyền một cách ổn định vì tất cả các hậu thể của một tế bào thâm nhiễm gốc đều như thể là một gen tế bào bình thường mà chẳng có hiệu ứng loại trừ nào cả. Điều này trái ngược với các virus khác như adenovirus hay pox-virus. Các virus này không hợp nhất các thông tin di truyền của chúng và giết chết các tế bào bị thâm nhiễm.

Sự thâm nhiễm retrovirus ở động vật thường đi cùng với sự cảm ứng gây khối u, như bệnh bạch cầu (leukaemias). Đây là kết quả của sự kiện hợp nhất được nhân lên dần dần dẫn tới sự hợp nhất ở bên trong hoặc ở vùng lân cận của các gen tế bào liên quan tới sự kiểm soát sinh trưởng (gen tiền ung thư hay gen ức chế khối u – proto-oncogene or tumour suppressorgene) do vậy dẫn đến việc làm mất chức năng, một quá trình được coi là đột biến điểm. Quá trình này đòi hỏi virus phải có khả năng nhân lên sự hợp nhất, tức là sao chép tích cực (replication-competent). Các vec tơ retrovirus khiếm khuyết về sao chép (xem dưới đây) chỉ hợp nhất một lần. Mà thời cơ để xảy ra sự hợp nhất retrovirus đơn trong một locus gen như thế thì cực kỳ thấp. Khi một gen tế bào đã bị tác động bởi sự hợp nhất retrovirus thì những tổn thương di truyền khác cũng chỉ có thể xảy ra khi các tế bào đã bị chuyển thành ác tính. Không có bằng chứng về sự hợp nhất retrovirus gây nên khối u ở người. Tuy nhiên, điều bắt buộc là không thể cho một virus sao chép cao nào có mặt trong các vec tơ retrovirus được dùng trong lâm sàng.

4.2.3 Sự sao chép, phiên dịch và lắp ráp

Sự sao chép của provirus đã hợp nhất được hướng bởi promoter virus và các yếu tố kích thích (enhancer element) định vị ở 5' LTR (bên trái) và 3'LTR (bên phải). Retrovirus mang 3 gen chính mã cho protein lõi virus (gen *gag*) tạo nên cấu trúc bên trong của virus, enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase), integrase (gen *pol*) và protein vỏ virus (gen *env*). Bản phiên mã đoạn hệ gen (genomic) sơ cấp mang tất cả các thông tin di truyền của virus và được sử dụng như hệ gen của các virion mới và cũng được dùng để tổng hợp các protein Gag và Pol. Bản phiên mã ghép nối thứ 2 được dùng để tổng hợp các protein Env của virus. Một số retrovirus mà đáng chú ý là lentivirus như HIV lại tạo ra các bản phiên mã ghép nối khác dùng để tổng hợp các protein phụ trợ điều hòa sự sản sinh virus.

Các protein Gag và Pol được tổng hợp như một polyprotein tiền thân từ bản phiên mã hệ gen và sau đó được cắt bớt đi để trở thành các protein chín (mature protein). Quá trình cắt bỏ vẫn còn tiếp tục trong khi lắp ráp virus, khi đâm chồi ở các tế bào chủ và ở phần ngoài của các tế bào chủ đã chín. Các domain của các protein tiền thân tương tác đặc hiệu với RNA virus (Zhang và Barklis, 1995), chắc chắn rằng RNA virus đã được đóng gói trong các virus hậu thể. Sự tương tác này đòi hỏi một hoặc nhiều trình tự RNA, đó chính là các tín hiệu đóng gói. Trên RNA hệ gen, bắt buộc phải có (Ψ) định vị ở đoạn đầu của vùng Gag, đúng vào 3' RNA đoạn cho ghép nối (splice donor-SD) dùng để sản xuất RNA tiểu hệ gen (subgenomic). Khi đó chắc chắn toàn bộ đoạn RNA virus đã được đóng gói.

Protein Env (SU và TM) được phiên dịch từ RNA virus tiểu hệ gen ghép nối (splice subgenomic). Những protein này được tổng hợp như một chất tiền thân có mang một peptide tín hiệu chuyển dịch nhanh ở các amino tận cùng vì vậy nó đi vào được hệ thống màng tiết của tế bào vật chủ. Khi đi qua hệ thống màng tiết thì chất tiền thân này được cải biến với các bước glycosyl hóa và cuối cùng thành các protein SU và TM chín nhờ

protease tế bào. Tuy nhiên, các protein này vẫn còn gắn với nhau bởi cầu disulphide và cuối cùng tới màng sinh chất tế bào vật chủ.

Bước cuối cùng của sự hợp nhất và giải phóng virion hậu thể sẽ xảy ra ở màng tế bào. Ở đó các protein Gag gắn với RNA hệ gen retrovirus, với RT virus và enzyme IN để tạo thành các cấu trúc capsid (Hình 4.1). Capsid này nảy chồi qua màng tế bào ở vùng tập trung nhiều protein Env trong virus.

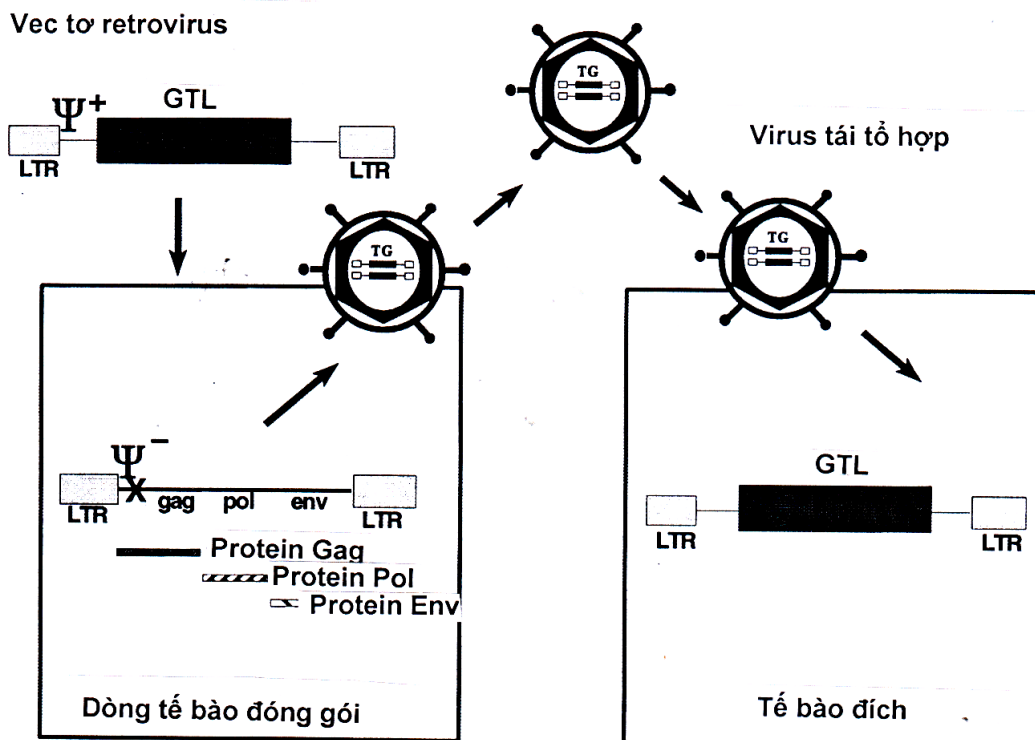
Các virion mới được giải phóng sẽ phải trải qua các bước đột biến xa hơn nữa với việc thay đổi cấu trúc protein cũng như tổ chức lại các protein virus ở phần lõi để được các virion hậu thể gây nhiễm chót. Cũng cần phải nhấn mạnh rằng, đối với hầu hết các retrovirus, toàn bộ quá trình thâm nhiễm và sản sinh virus không làm tổn thương tới sự sản sinh của tế bào vật chủ.

4.3 Phát triển các vec tơ retrovirus

Hệ thống vec tơ retrovirus đầu tiên từ virus gây bệnh bạch cầu ở chuột (murine leukaemia virus-MLV) đã và đang được sử dụng trong các tiến trình lâm sàng. Có nhiều lý do để lựa chọn MLV làm hệ thống vận chuyển gen: (i) các đặc tính sinh học của retrovirus đã được hiểu rất rõ, (ii) hệ gen MLV là một trong những hệ gen retrovirus được tách dòng phân tử sớm nhất và (iii) những virus này có khả năng thâm nhiễm tốt các tế bào. Vì MLV chỉ có khả năng thâm nhiễm các tế bào loài gặm nhấm nên gọi là *ecotropic*. Các protein SU của *ecotropic* tương tác với một amino acid của một protein vận chuyển có ở màng sinh chất của các tế bào đích (Kim và cộng sự., 1991; Wang và cộng sự., 1991). Tuy nhiên, chức năng này không thể hiện được trên các tế bào của người, vì thế MLV *ecotropic* không có khả năng thâm nhiễm các tế bào người trừ phi nó đã được công nghệ hóa. Một MLV khác lại có khả năng thâm nhiễm nhiều loại tế bào kể cả người và gặm nhấm. Protein SU của virus lưỡng tính (*amphotropic*) này tương tác với một protein vận chuyển phosphate của tế bào (Miller và Miller, 1994; van Zeijl và cộng sự., 1994). Các MLV lưỡng tính đang được sử dụng nhiều trong các tiến trình gen trị liệu (GTL). Vỏ của virus gây bệnh bạch cầu trên vượn (gibbon ape leukaemia virus -GaLV) cũng được sử dụng bởi vì vỏ GaLV mang các vec tơ retrovirus rất thuận lợi cho việc chuyển gen tế bào máu (Bunnell và cộng sự., 1995).

4.3.1 Nguyên lý

Các hệ vec tơ retrovirus bao gồm 2 thành phần: (i) một cấu trúc vec tơ mang các gen được chuyển giao và hệ gen cho virus tái tổ hợp và (ii) một dòng tế bào cung cấp các protein virus cần thiết cho việc sản xuất virus tái tổ hợp, đó chính là các tế bào đóng gói (Hình 4.2). Nguyên nhân xuất hiện hệ thống 2 thành phần này là do có sự cài thêm các thông tin di truyền vào trong hệ gen MLV. Điều đó gây bất lợi cho việc sản xuất virus vì nó đã loại bỏ trình tự mã hóa gen cấu trúc và bắt buộc phải cung cấp các protein *in trans* này từ các tế bào đóng gói. Mặc dù có khả năng tạo được các vec tơ retrovirus một thành phần có khả năng sao chép cao (*one-component replication-competent retrovirus vectors*) chẳng hạn như HIV hay virus gây ung thư Rous (Rous sarcoma virus), nhưng dường như nó không giống như cách nhìn nhận trên mà lại liên quan tới một quá trình đột biến gây ra bởi trung gian retrovirus.



Hình 4.2 Nguyên lý sản xuất vec tơ retrovirus. Vec tơ này gồm có một provirus mang gen, chẳng hạn như một gen trị liệu (TG), thay cho thông tin di truyền của virus. Gen này được đưa vào dưới sự kiểm soát của phiên mã chẳng hạn như promoter virus được định vị ở đoạn lặp tận dài (long terminal repeat -LTR). Vec tơ được đưa vào một dòng tế bào (dòng tế bào đóng gói) có mang retrovirus đã được cải biến. Provirus này sẽ tạo ra protein virus mà vec tơ không tạo ra được bởi vì nó không có tín hiệu đóng gói thích ứng (Ψ). Cấu trúc của vec tơ này có mang tín hiệu đóng gói Ψ và vì vậy RNA được phiên mã từ cấu trúc này dễ dàng cài được vào các hạt virus mới được tạo thành (luôn luôn được giải phóng từ các tế bào đóng gói). Các hạt virus có mang hệ gen vec tơ sau đó được dùng để thâm nhiễm tế bào đích, hướng dẫn sự phiên mã ngược và rồi cuộc hợp nhất với hệ gen vec tơ có mang gen trị liệu (TG). Gen này sẽ được biểu hiện tạo ra protein trị liệu trong tế bào đích. Không có virus nào nữa được tạo thành bởi vì protein cấu trúc của virus không có ở trong các tế bào này.

(Theo walter H. Gunzburg và Brian Salmons. Gene Therapy Technologies, Applications and regulations. John Wiley & Sons Ltd 1999).

Để tạo ra các virion vec tơ retrovirus người ta phải thiết lập một vec tơ có mang các gen để vận chuyển, chúng được đưa vào các dòng tế bào đóng gói retrovirus bằng phương pháp vật lý (chẳng hạn như sự chuyển nhiễm (transfection) hay electroporation). Các tế bào đóng gói này sản xuất các protein cấu trúc virus (Gag và Env) và các enzyme (pol-encoded RT, IN), nhưng chúng không đóng gói được RNA virus mã cho các protein này vì vùng Ψ cần cho capsid hóa (encapsidation) đã bị loại bỏ. Thay vào đó các protein làm nhiệm vụ nhận biết và gắn với RNA đoạn hệ gen từ các vec tơ được cài vào lại mang một vùng Ψ nguyên bản, do đó có thể tạo nên các hạt virus tái tổ hợp. Các hạt virus tái tổ hợp có mang hệ gen vec tơ retrovirus đâm chồi ra khỏi các tế bào đóng gói để vào môi trường

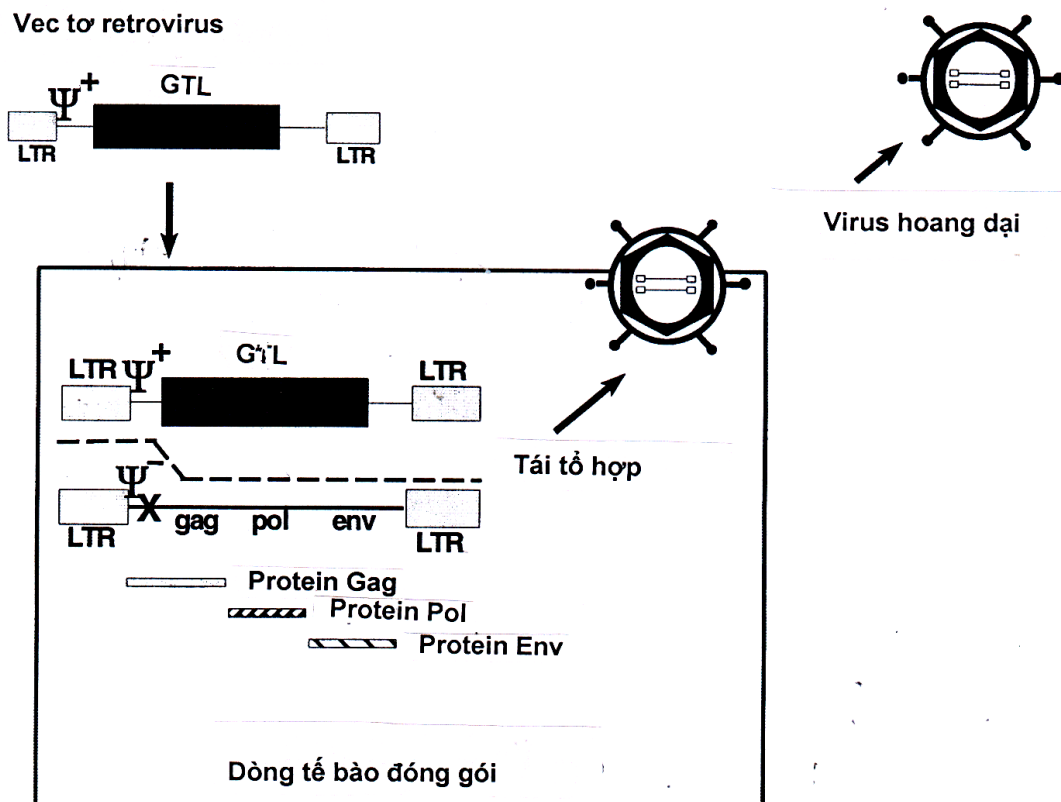
nuôi cấy tế bào. Môi trường chứa virus có thể được lọc trực tiếp để loại bỏ các tế bào và các mảnh vỡ của tế bào rồi dùng để thâm nhiễm cho các tế bào đích, hoặc virus sẽ được làm tinh khiết và cô đặc lại trước khi thâm nhiễm các tế bào đích. Sau khi virus đã gắn vào các receptor trên bề mặt tế bào thì capsid của virus sẽ được chuyển vào bên trong tế bào và RNA virus được phiên mã ngược thành DNA để hợp nhất vào DNA tế bào vật chủ. DNA virus đã hợp nhất (provirus) có chức năng như bất kỳ một gen nào khác của tế bào và nó chỉ đạo việc tổng hợp các sản phẩm của các gen đã được chuyển vào. Tuy nhiên, không giống như trường hợp virus hoang dã bình thường có khả năng sao chép cao (đã được trình bày ở Hình 4.2), không có virus thâm nhiễm nào lại có thể được sản xuất bởi các tế bào đã bị thâm nhiễm vì thông tin di truyền mã cho protein virus không có trong các tế bào này (Hình 4.2)

Vấn đề mấu chốt với hệ vec tơ retrovirus 2 thành phần chính là hệ quả của một hiện tượng xảy ra một cách tự nhiên đó là sự tái tổ hợp xảy ra ở cùng vị trí (homologous). Nếu provirus vec tơ và provirus cung cấp các protein cấu trúc có trong sự tổ hợp các tế bào đóng gói thì có thể làm tăng khả năng của các virus sao chép cao (Hình 4.3; Miller và Buttimore, 1986; Muenchau và cộng sự., 1990). Virus này chính là các retrovirus dạng hoang dã không mang các gen vận chuyển. Các virus sao chép cao thâm nhiễm nhanh chóng nhiều tế bào và có thể gây nên các trường hợp đột biến. Vì vậy nỗ lực lớn trong việc tạo ra mẫu hệ thống đóng gói tuyệt hảo là giảm thiểu khả năng xảy ra tái tổ hợp, cải tiến nâng cấp các vec tơ cũng như nâng cao tính an toàn của chúng bằng cách ngăn chặn sự sao chép ngay cả khi xảy ra sự tái tổ hợp.

4.3.2 Những bước cải tiến

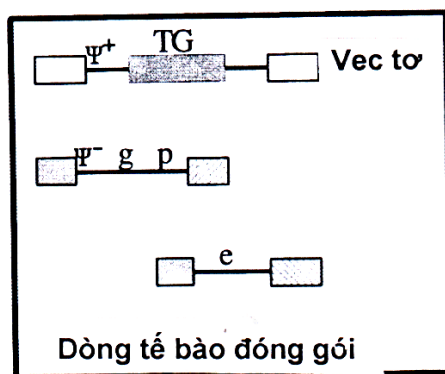
Cải tiến nâng cấp các tế bào đóng gói liên quan tới việc loại bỏ càng nhiều càng tốt các thông tin di truyền của retrovirus để giảm thiểu khả năng xảy ra tái tổ hợp tương đồng (Hình 4.4). Promoter và các trình tự kết thúc của retrovirus sẽ được thay thế bằng các promoter và các trình tự kết thúc tương đồng. Điều đó sẽ làm tăng hoạt tính của các promoter và sự sản xuất protein virus sẽ được tăng cường. Mã thông tin cho các protein có thể không cần phải loại trừ vì những protein này có thể được tổng hợp từ các cấu trúc tách biệt để thực hiện sự tái tổ hợp nhằm kiến tạo lại retrovirus có khả năng sao chép cao hoàn thiện. Thành quả này là do sự biểu hiện protein Gag và Pol từ một cấu trúc còn protein Env từ một cấu trúc thứ 2 (Markowitz và cộng sự., 1988).

Để nâng cấp các tế bào đóng gói, các cấu trúc vec tơ retrovirus an toàn hơn sẽ được cải tiến thêm một mã kết thúc nhân tạo ở khung đọc Gag. Điều này đảm bảo rằng nếu như virus sao chép cao có được sản sinh thì cũng không có khả năng biểu hiện các protein Gag và Pol và như vậy việc lắp ráp và tháo dỡ virus sẽ bị ức chế (Bender và cộng sự., 1991; Morgenstern và Land, 1990; Scarpa và cộng sự., 1991). Một chiến lược khác tạo ra cơ chế tự phục hồi nhằm phòng ngừa nguy cơ thâm nhiễm của virus có khả năng sao chép cao chắc chắn là phải loại trừ các trình tự đóng gói. Phần lớn provirus vec tơ trong các tế bào đã bị thâm nhiễm với các vec tơ như thế thì đã loại trừ hết các trình tự đóng gói, có lẽ là do sự chuyển đổi khuôn mẫu trong khi phiên mã ngược (Julias và cộng sự., 1995)



Hình 4.3 Sự sản sinh cácvirus (hoang dã) sao chép cao theo phương pháp tái tổ hợp. Hệ thống vec tơ retrovirus khởi đầu này thường gây nhiễm bẩn rất nhanh bởi vì virus sao chép cao có ít nhất là một sự kiện tái tổ hợp tương đồng (dấu chấm) xảy ra giữa cấu trúc vec tơ và cấu trúc đóng gói trong tế bào đóng gói. Khả năng này phụ thuộc vào mức độ tương đồng giữa 2 cấu trúc này. (Theo walter H. Gunzburg và Brian Salmons. Gene Therapy Technologies, Applications and regulations. John Wiley & Sons Ltd 1999).

Hệ thống Cre/lox P recombinase cũng hợp nhất với vec tơ virus và được sử dụng để cắt bớt một cách đặc hiệu các trình tự vec tơ trong các tế bào đích đã bị thâm nhiễm (Cholika và cộng sự., 1996; Russ và cộng sự., 1996). Các vec tơ cũng được thiết kế có mang vị trí gắn primer nhân tạo cải tiến (primer binding site) (Lund và cộng sự., 1997). Thông thường thì tRNA tế bào gắn vào RNA hệ gen và được sử dụng như một primer cho sự khởi đầu phiên mã ngược. Trong việc tổ hợp với các tế bào đóng gói cũng cần phải có tRNA nhân tạo. Tuy nhiên, bất kỳ một virus sao chép cao nào được sản xuất từ hệ thống này do sự tái tổ hợp tương đồng thì cũng không có khả năng sao chép trong các tế bào đã từng bị thâm nhiễm vì các tế bào thâm nhiễm thì không tổng hợp được tRNA nhân tạo mong muốn (Lund và cộng sự., 1997)



Hình 4.4 Cải tiến hệ thống vec tơ retrovirus. Để giảm bớt khả năng tái tổ hợp tương đồng dẫn đến việc hình thành retrovirus sao chép cao, hệ thống phải được thiết kế sao cho chỉ các trình tự virus thiết yếu nhất mới được tồn tại trong vec tơ cùng các cấu trúc đóng gói. Các promoter dị loại và các tín hiệu kết thúc đã tạo thuận lợi cho công việc này. Hơn nữa, với các hệ thống gồm 3 thành phần như thế, trong 2 cấu trúc độc lập thì một biểu hiện các sản phẩm của gen Gag (g) và gen Pol (p) còn cấu trúc thứ hai biểu hiện protein Env (e). Để tạo ra các virus sao chép cao đòi hỏi ít nhất là có 3 sự cố tái tổ hợp xảy ra giữa vec tơ và các cấu trúc đóng gói.
(Theo walter H. Gunzburg và Brian Salmons. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

4.4 Đích thâm nhiễm

Các receptor với SU (và GalV) lưỡng tính được biểu hiện ở nhiều dạng tế bào vì thế chúng ta cần phải thảo luận về phổ thâm nhiễm hỗn tạp trên các vec tơ retrovirus cơ sở MLV. Vì lý do về an toàn và hiệu lực nên người ta thường làm thay đổi hướng hoặc làm giới hạn lại phổ thâm nhiễm của các vec tơ retrovirus sao cho chỉ các tế bào đích mới bị thâm nhiễm. Để đáp ứng đòi hỏi này người ta phải cải tiến hoặc làm thay đổi protein vỏ MLV để cho chúng tương tác được nhiều hơn với các receptor tế bào riêng biệt. Có nhiều chiến lược đã được thực hiện nhằm đạt được mục tiêu này (Salmons và Günzber, 1993). Nhiều công trình nghiên cứu về các vec tơ MLV cải tiến đã xác định được đích của sự thâm nhiễm vì các retrovirus này không thể thâm nhiễm một cách bình thường các tế bào người hay các tế bào khác không phải là chuột.

Để nghiên cứu đích thâm nhiễm, người ta sử dụng kháng thể kháng trực tiếp các protein biểu lộ trên bề mặt tế bào đích, chúng được gắn qua streptavidin tới các kháng thể đặc hiệu cho protein Env. Hệ thống kháng thể này kháng trực tiếp lớp I và II hệ thống hòa hợp tổ chức chính (Roux và cộng sự., 1989) hoặc kháng lại receptor của các yếu tố tăng trưởng bì (epidermal growth factor) (Etienne- Julian và cộng sự., 1992). Qua hệ thống này người ta thấy đích của sự thâm nhiễm nằm trên bề mặt các tế bào biểu lộ các phân tử protein, nhưng hiệu lực còn thấp. Một trở ngại khác nữa là không phải tất cả các receptor đều thích hợp đối với virus hoặc có thể vẫn còn tác dụng ở các bước sau trong chu kỳ sống của virus (Goud và cộng sự., 1988).

Mấy năm trước đây, chiến lược phổ biến nhất đối với việc cải tiến nâng cấp phổ thâm nhiễm các vec tơ retrovirus là công nghệ hóa gen *env* của virus trong các tế bào đóng gói retrovirus. Điều này đã tạo thuận lợi cho việc xác định các vùng của protein SU Env có liên quan tới sự nhận dạng receptor (Battini và cộng sự., 1992, 1995; Morgan và cộng

sự., 1993; Ott và Rein, 1992). Những vùng này được thay thế bằng các đoạn gen mã cho các epitope có thể nhận dạng được các receptor khác như erythropoietin (Kasahara và cộng sự., 1994) hay heregulin (Han và cộng sự., 1995), do vậy nó cho phép kiểm soát một cách chọn lọc đích receptor của protein Env chimeric.

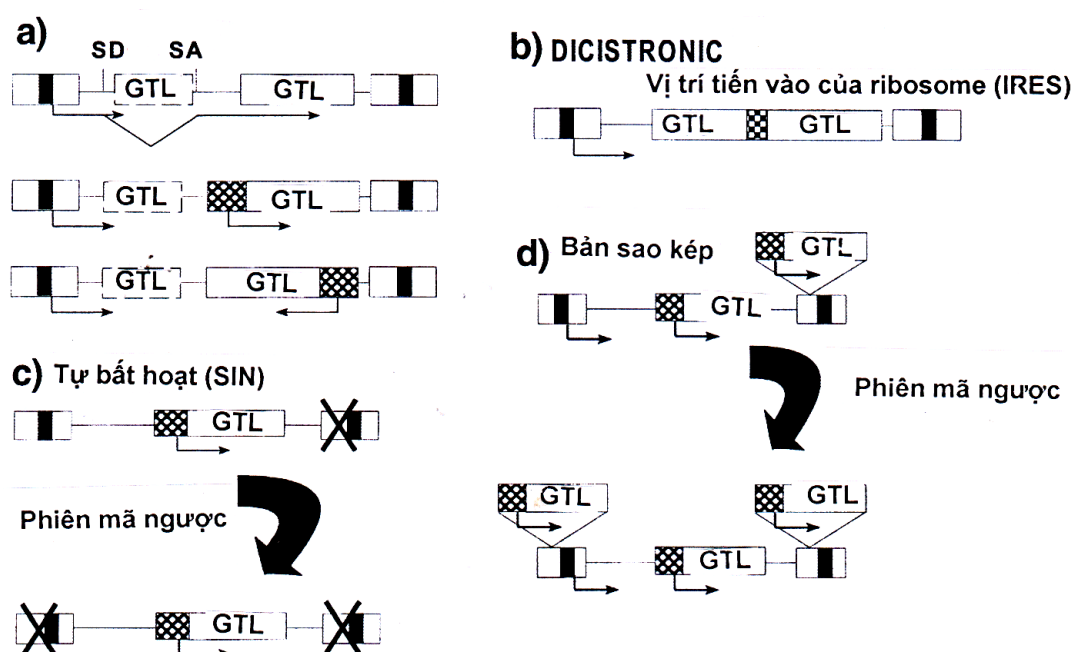
Cuối cùng, các ligand đích đã được cài vào đầu tận amino của các protein nằm giữa amino acid 6 và 7 (Cosset và cộng sự., 1995; Marin và cộng sự., 1996; Russell và cộng sự., 1993). Theo hướng này, protein ligand – Env sẽ được sản xuất trong các tế bào đóng gói còn các protein vỏ retrovirus không bị cải biến sẽ giữ vai trò làm ổn định, bởi vì các protein Env là các trimer trên bề mặt virus. Các domain đã biến đổi của các kháng thể chuỗi đơn đặc hiệu cho một receptor xác định (protein bề mặt tế bào) cũng là đích thâm nhiễm của các vec tơ retrovirus (Chu và Dornburg, 1995; Marin và cộng sự., 1996; Russell và cộng sự., 1993; Somia và cộng sự., 1995). Mặc dù đích thâm nhiễm của retrovirus mà phần protein lớp vỏ được cải biến đã thu được thắng lợi nhưng độ chuẩn vẫn còn giảm, lý do có lẽ giống như các vấn đề mà chúng ta đã đề cập ở trên. Những thao tác như vậy với protein SU virus cũng làm giới hạn giá trị sử dụng bởi vì sự tổng hợp cũng như xử lý tương đối phức tạp protein này phải đảm bảo cả về chức năng cũng như khả năng hợp nhất các hạt virus tổng hợp mới. Những đòi hỏi này bắt buộc phải thay thế hoặc cải tiến bởi vì cấu hình của các domain phải thật phù hợp. Rõ ràng là cần phải hiểu rõ hơn nữa về cơ chế điều khiển các chức năng bình thường của protein vỏ virus trước khi thiết lập lớp vỏ theo phương pháp hóa học thì mới có thể làm cho các protein này nhận dạng được các receptor và khởi đầu sự thâm nhiễm một cách hiệu quả.

Gần đây, Steven Russell và cộng sự (Nilson và cộng sự., 1996) đã đưa ra một chiến lược mới gồm 2 bước, hy vọng cách mạng hóa đích các vec tơ retrovirus đối với các receptor xác định. Protein vỏ virus được cải biến bằng cách thêm vào một vị trí gần protease và chọn lọc domain ligand receptor ở đầu cuối protein SU. Sau khi gắn đúng receptor trên các tế bào đích, receptor/ligand có thể được loại trừ bởi protease (Nilson và cộng tác., 1996). Sau đó retrovirus được gắn vào các receptor thông thường cũng như trên tế bào đích. Điều đó cho phép retrovirus đi vào được bên trong tế bào theo cách tự nhiên, khắc phục vấn đề thường xảy ra là retrovirus lại sử dụng các receptor không phải của retrovirus (Etienne-Julan và cộng sự., 1992). Độ chuẩn đạt tới 10^6 đơn vị khuẩn lạc trên một mililit môi trường nuôi cấy tế bào (10^6 cfu/ml colony forming units per millilitre cell culture medium) nhờ việc sử dụng domain gắn EGF như một phương tiện xác định đích trong hệ thống gồm 2 bước này (Nilson và cộng sự., 1997). Việc sử dụng phage biểu lộ các thư viện cũng rất hứa hẹn đối với việc phát hiện các ligand có lợi. Những thư viện như vậy tạo thuận lợi cho việc sàng lọc nhanh các peptide có khả năng gắn vào các receptor trên các dạng tế bào đặc biệt. Những peptide được xác định bằng hệ thống sàng lọc này có thể hợp nhất với bất cứ hệ thống chuyển gen nào kể cả các vec tơ retrovirus để có được các đích thâm nhiễm (Barry và cộng tác., 1996). Một hệ thống tương tự như vậy cũng được sử dụng để xác định sự thâm nhiễm đích, đó là việc ngăn chặn sự xâm nhiễm retrovirus với các tế bào đích không mong muốn. Theo cách này thì đầu tận cùng của protein SU sẽ được gắn với vị trí rãnh, thêm vào đó một peptide che khuất domain gắn SU cũng như một ligand đặc hiệu cũng phải có mặt trên tất cả các tế bào không phải là đích.

4.5 Sự biểu hiện gen từ các vec tơ retrovirus

4.5.1 Xem xét chung

Các gen dị loại được chuyển giao bằng các vec tơ retrovirus có thể được biểu hiện theo nhiều cách khác nhau (Hình 4.5). Promoter retrovirus trong LTR có thể điều khiển sự biểu hiện của các gen dị loại khi các gen này đã được phân dòng trong các vị trí cũ của *gag*. Thật vậy, lợi thế này đã được tận dụng để chuyển và biểu hiện đồng thời 2 gen chẳng hạn như một gen trị liệu và một dấu chuẩn gen. Gen thứ 2 này có thể được cài vào vị trí *env* và được biểu hiện từ RNA virus tiểu hệ gen (subgenomic). Nhưng điều bất lợi là promoter retrovirus không có năng lực đặc biệt và nó có thể bị đóng lại hoặc bị lặn sau một thời kỳ biến đổi ở nhiều dạng tế bào (Lund và cộng sự., 1996; Xu và cộng sự., 1989) hoặc ở trong các tế bào động vật chuyển gen (Richards và Huber, 1993; Vernet và Cebrian, 1996). Các biện pháp để phòng sự sao chép câm ở một số dạng tế bào là sự methyl hóa, biến đổi LTR cũng như làm trôi dạt các trình tự ở một số dạng tế bào (Lund và cộng sự., 1996)



Hình 4.5 Sự biểu hiện các cấu trúc cấu trúc vec tơ retrovirus. Các gen trị liệu (TG) có thể được biểu hiện theo nhiều cách từ cấu trúc vec tơ. Ở (a) và (b) TG được biểu hiện trực tiếp từ promoter retrovirus như một bản phiên mã dài hệ gen – genomic length transcript- (a) hoặc như một bản phiên mã ghép. Các vec tơ retrovirus có thể điều tiết một hoặc 2 gen. Việc cài một lối vào bên trong ribosome đã cho phép gen thứ 2 được biểu hiện từ cùng một RNA hệ gen như ở (b). TG cũng có thể được biểu hiện từ một promoter dị loại đã được cài vào các vec tơ retrovirus (a), bao hàm ý nghĩa là sự định hướng antisense. Các vec tơ tự bất hoạt (self-inactivating-SIN) và sao chép kép (double copy- CD) được chỉ trên (c) và (d) có mang 3'LTR, điều đó dẫn đến làm mất promoter retrovirus (SIN) hoặc nhân đôi của hộp biểu hiện (promoter dị loại gắn với TG) trong tế bào thâm nhiễm.

(Theo walter H. Gunzburg và Brian Salmons. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

Sự biểu hiện của các gen chuyển bằng các vec tơ retrovirus cũng phụ thuộc vào vị trí hợp nhất trong hệ gen tế bào chủ. Sự điều hòa đặc hiệu mô từ các promoter gen dị loại có thể bị suy yếu hoặc bị lấn át bởi các yếu tố điều hòa mạnh của tế bào định vị ở vùng lân cận vị trí hợp nhất. Các vùng kiểm soát locus (locus control regions – LCR), các yếu tố điều hòa tạo nên sự biểu hiện gen ở mức cao và độc lập vị trí (Dillon và Grosveld, 1993), điều đó giúp cho các vec tơ retrovirus hoạt động được. Khối trình tự dưới lõi LCR (LCR core sub sequence) gồm 36 cặp base của gen β – globin người trong vec tơ retrovirus chuyên chở gen này nhằm nâng cao sự biểu hiện của gen β – globin trong các tế bào hồng cầu chuột, nhưng mức biểu hiện vẫn còn dưới mức tối ưu đối với trị liệu (Chang và cộng sự., 1992). Tuy nhiên, một cấu trúc vec tơ retrovirus tương tự cũng làm biến đổi rất lớn mức độ biểu hiện ở các dòng tế bào thâm nhiễm (4-146%) (Sadelain và cộng sự., 1995). Như vậy, có thể là có nhiều vùng LCR cần cho sự biểu hiện độc lập vị trí. Một chiến lược khác đảm bảo cho việc biểu hiện độc lập vị trí (position- independent expression) của các gen trong các vec tơ retrovirus là tránh cho chúng khỏi hiệu ứng nâng cao hoặc hạ thấp ở vùng lân cận vị trí hợp nhất (Duch và cộng sự., 1994). Có nhiều vật cách ly như vậy đã được xác định ở ruồi giấm (Gerasimova và Corces, 1996) và ở các tế bào động vật (Felsenfeld và cộng sự., 1996), những vật cách ly này có thể được hợp nhất vào trong các vec tơ retrovirus tương lai.

Sự tự bất hoạt (self- inactivating- SIN) (Yu và cộng sự., 1986) và các vec tơ sao chép kép (double-copy-DC) (Hanztopoulos và cộng sự., 1989) đã tận dụng một đặc tính đặc biệt về chu kỳ sống của retrovirus, đó là sự phiên mã ngược của RNA hệ gen virus thành dạng sợi kép. Trong quá trình này, các trình tự từ đầu 5' của RNA (U5) được nhân đôi và đặt thêm vào ở đầu 3' của DNA, trong khi đó các trình tự từ đầu 3' của RNA (U3) lại được sao chép về phía trên đầu 5' của DNA. Quá trình này đã tạo được các cấu trúc LTR đồng nhất nằm bên sườn hệ gen virus. Promoter của retrovirus được định vị trong vùng U3, điều đó có nghĩa là promoter này đã có trong các tế bào thâm nhiễm từ vùng U3 ở đầu 3' của RNA. Trong các vec tơ SIN, U3 bị loại trừ do đó dẫn đến một provirus đã hợp nhất lại không có promoter retrovirus trong các tế bào thâm nhiễm. Khối promoter dị loại bên trong sẽ chỉ là promoter để hướng dẫn sự biểu hiện của các gen đã được chuyển giao. Các vec tơ DC, bao gồm một promoter dị loại gắn vào gen đã được vận chuyển sẽ được cài vào vùng U3 trong 3'LTR của vec tơ và sẽ được nhân đôi sau phiên mã ngược, điều đó đảm bảo chắc chắn rằng hợp gen – promoter hiện diện 2 lần (tức là có sự sao chép kép) trong các tế bào đích. Vùng R cũng có thể là một vị trí để cài gen bởi vì các cDNA mã cho MyoD và nucleoside purin phosphorylase (PNT) đã cài được vào vùng này của LTR (Adam và cộng sự., 1995).

Việc sử dụng các vị trí tiến vào bên trong ribosome (internal ribosome entry site – IRES) trong các vec tơ retrovirus cho phép 2 hoặc nhiều gen được biểu hiện từ cùng một bản phiên mã của một promoter đơn (Koo và cộng sự., 1992; Levine và cộng sự., 1991). Những vec tơ này có độ chuẩn cao hơn nên cho phép cài được các đoạn gen dị loại lớn hơn và làm ổn định hơn sự biểu hiện của các gen đã được vận chuyển (so với các vec tơ 2 gen, 2 promoter) và tránh được sự giao thoa giữa các promoter (multiple promoter) cùng có mặt trên các vec tơ retrovirus (Li và cộng sự., ; Xu và cộng sự., 1989).

4.5.2 Đích thâm nhiễm

Cũng như sự thâm nhiễm đích, thông qua việc đổi hướng tính đặc hiệu thâm nhiễm có thể làm giới hạn biểu hiện của các gen trị liệu khi sử dụng các promoter từ các gen đã được biểu hiện một cách đặc hiệu hoặc biểu hiện ưu tiên hơn ở các dạng tế bào xác định. Như thế thì một vec tơ retrovirus có thể chuyển một gen tới nhiều dạng tế bào (nếu không có đích thâm nhiễm) nhưng điều đòi hỏi lại là gen này chỉ được biểu hiện trong một dạng tế bào mà thôi.

Tính đặc hiệu nghiêm ngặt có liên quan với sự thâm nhiễm cũng như đích biểu hiện.

Trong các vec tơ retrovirus người ta đã cho dư promoter tác động ưu tiên trong một số dạng tế bào đặc biệt. Chẳng hạn như các promoter đặc hiệu tế bào gan (và u gan) từ phosphoenolpyruvate carboxylase (Hafenrichter và cộng sự., 1994; Hatzoglou và cộng sự., 1990; McGrane và cộng sự., 1988), β -fetoprotein (Huber và cộng sự., 1991), β_1 -antitrypsin (Hafenrichter và cộng sự., 1994; Rettinger và cộng sự., 1994), các gen albumin (Hafenrichter và cộng sự., 1994) và các promoter tác động một cách ưu tiên trong các khối u chẳng hạn như gen tyrosinase cho sự biểu hiện đích đối với u hắc tố (Vile và cộng sự., 1995) và *erb* B-2 cho các khối u ở vú (Harris và cộng sự., 1994).

Các vec tơ biểu hiện sớm gen chuyển từ các promoter dị loại có thể gây cảm ứng hoặc đặc hiệu mô đã được cài vào vec tơ. Tuy nhiên, cấu hình này thường chịu tác động giao thoa của phiên mã vì có mặt cả promoter retrovirus và promoter dị loại.

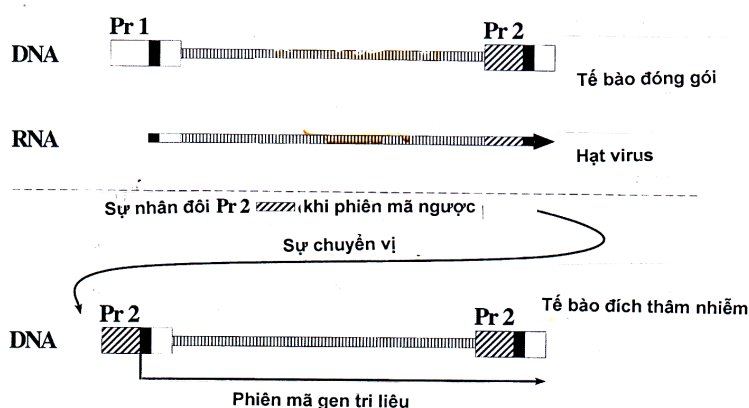
Hiệu ứng giao thoa này có thể làm mất sự biểu hiện của một hoặc cả 2 promoter hoặc mất tính đặc hiệu mô hay cảm ứng biểu hiện từ các promoter dị loại. Gần đây hơn, các vec tơ mang promoter dị loại /yếu tố tăng cường (enhancer) trong LTR được thay cho promoter retrovirus/ yếu tố tăng cường (Ferrari và cộng sự., 1995; Vile và cộng sự., 1995).

Những vec tơ mà promoter được chuyển đổi từ MLV trong các dòng tế bào đóng gói đã được đưa vào promoter dị loại các tế bào đích thâm nhiễm được gọi là vec tơ chuyển đổi promoter (promoter conversion (ProCon) vectors) (Günzburg và cộng sự., 1995; Salmons và cộng sự., 1995). Vì thế vẫn còn tồn tại một số vấn đề cần xem xét về tính an toàn của các vec tơ này chẳng hạn (i) nếu như không có các trình tự promoter virus thì sẽ làm giảm tần số tái tổ hợp với các trình tự virus trong tế bào đích và (ii) chưa chỉ rõ được rằng promoter từ một gen tế bào có thể hoạt hóa hay làm bất hoạt các gen của tế bào trong retrovirus.

4.5.3 Các promoter có thể cảm ứng được

Promoter glucocorticoid có thể cảm ứng được của virus gây khối u ở vú chuột (Günzburg và Salmons, 1992) đã được sử dụng trong vec tơ ProCon để điều hòa sự biểu hiện gen trong nuôi cấy tế bào (Günzburg và cộng sự., 1997; Mrochen và cộng sự., 1997). Promoter này có lẽ là ít tác dụng bởi vì nó là một promoter cảm ứng *in vivo* mặc dù nó có thể là đích biểu hiện gen đối với các tế bào tuyến vú và các tế bào lympho B (Günzburg và Salmons, 1992). Cannon và cộng sự đã dùng nguyên lý của ProCon để tạo ra MLV – một vec tơ từ retrovirus, vec tơ này sử dụng promoter HIV có thể cảm ứng Tat (Tat inducible HIV promoter) sau khi tế bào bị thâm nhiễm. Vec tơ này hữu dụng trong việc biểu hiện các gen trị liệu trong các tế bào bị nhiễm HIV. Tăng sự biểu hiện gen này sẽ làm hạn chế các tế bào bởi vì chỉ có các tế bào nhiễm HIV mới biểu hiện Tat (Cannon và cộng sự.,

1996). Các vec tơ retrovirus mang promoter cảm ứng tetracyclin cũng đã được thiết lập để biểu hiện gen (Paulus và cộng sự., 1996).



Hình 4.6 Sự chuyển đổi promoter của các vec tơ retrovirus. Cấu trúc của vec tơ có mang promoter retrovirus (Pr1; promoter 1) ở vùng U3 của 5'LTR hướng sự biểu hiện của RNA hệ gen virus trong dòng tế bào đóng gói. 3'LTR được lựa chọn để điều khiển việc biểu hiện gen trong các tế bào bị thâm nhiễm (Pr 2). Cần lưu ý rằng trình tự này chỉ là một promoter có mặt trong RNA hệ gen mà nó đã được đóng gói trong các hạt virus.. Trước khi thâm nhiễm các tế bào đích, RNA được chuyển đổi thành phân tử DNA sợi kép nhờ enzyme phiên mã ngược. Kết quả là nhân đôi Pr 2 và chuyển vị một bản phiên mã tới đầu 5' của DNA provirus, đó là promoter duy nhất được dùng để điều khiển sự biểu hiện gen trong tế bào thâm nhiễm.

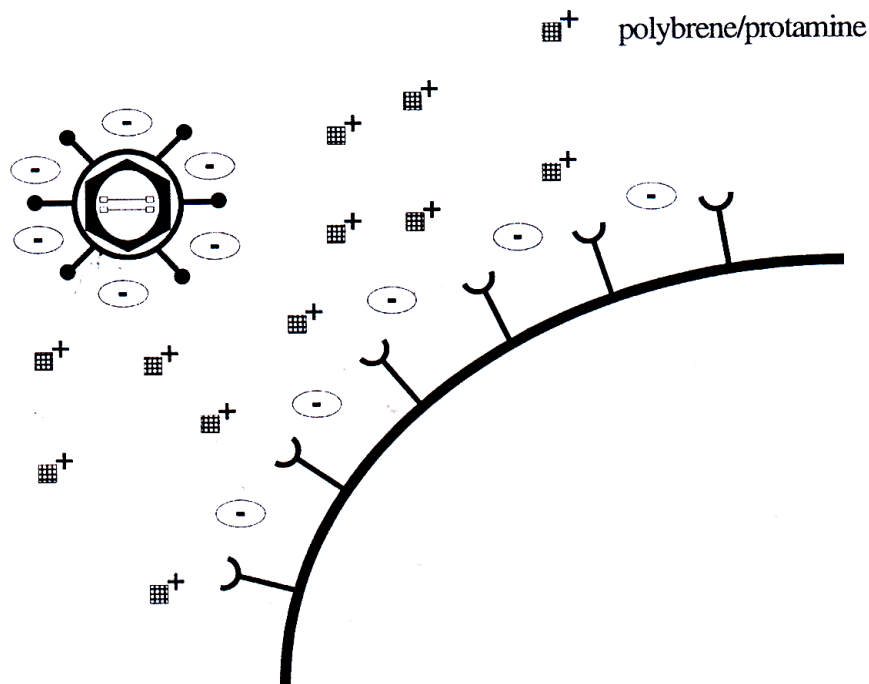
(Theo walter H. Gunzburg và Brian Salmons. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

4.6 Độ chuẩn và tính ổn định của các vec tơ retrovirus

Độ chuẩn virus và các vec tơ virus thường được đo bằng hiệu lực tác dụng của virus trên các tế bào đích. Thông thường với các vec tơ virus thì đây là số tế bào nhận và biểu hiện một gen dấu chuẩn enzyme có khả năng sinh ra phản ứng màu chẳng hạn như β -galactosidase, hoặc có thể lựa chọn một gen kháng kháng sinh cho phép phân biệt được các tế bào thâm nhiễm trên cơ sở là chúng có thể tồn tại được trong môi trường có chứa kháng sinh. Vì thế, độ chuẩn là đại diện của các đơn vị chức năng virus chứ không phải là con số tuyệt đối các hạt virus. Một bất lợi thường được đề cập với các vec tơ retrovirus là độ chuẩn của nó dường như thấp hơn các vec tơ virus khác chẳng hạn như adenovirus và các vec tơ adenovirus liên hợp (adeno-associated virus vector) ngay cả khi độ chuẩn retrovirus đạt tới 10^7 cfu/ml. Gần đây đã có bằng chứng cho thấy độ chuẩn retrovirus cao hơn rất nhiều so với các thông báo trước đó vì trong môi trường nuôi cấy có chứa các virus vec tơ thì có một lượng đáng kể virus vec tơ thâm nhiễm sẽ chuyển dần dần các tế bào thành không thâm nhiễm (Tavoloni, 1997). Một câu hỏi lớn là liệu độ chuẩn chức năng được xác định trên một số giới hạn các dòng tế bào thiết lập (chẳng hạn như tế bào NIH3T3) trong môi trường có phản ánh trung thực hay không số virus vec tơ có khả năng chuyển giao một gen tới các tế bào sơ cấp hoặc tới các tế bào *in vivo* (Foresstell và cộng sự., 1995). Hơn nữa, nếu ta lạc quan về độ chuẩn virus trên các tế bào đã được thiết lập như thế thì có thể là chưa chính xác vì những tế bào này không phản ánh hết các đặc

tính sinh học của các tế bào đích thích hợp đối với gen trị liệu. Tuy nhiên, đã có nhiều phương pháp hóa lý được sử dụng nhằm làm tăng độ chuẩn *in vitro*. Công việc này bao gồm sự cô đặc (Kotani và cộng sự., 1994); Paul và cộng sự., 1993), tạo luồng thâm nhiễm trong đó các tế bào được phát triển trên các màng lọc có lỗ để virus có thể được đi qua các lỗ này (Chuck và Palsso, 1996), xử lý các tế bào sản xuất vec tơ với sodium butyrate (Olsen và Sechelski, 1995; Pages và cộng sự., 1995; Soneoka và cộng sự., 1995). Chắc chắn là chúng ta cần phải nỗ lực nhiều hơn nữa mới biết được các yếu tố lý hóa và sinh học tác động tới tính ổn định và độ chuẩn virus. Thời gian bán sống của các vec tơ retrovirus MLV trong môi trường nuôi cấy tế bào đo được là 3,5 – 9 giờ ở 37 °C (Chuck và cộng sự., 1996; Kaptein và cộng sự., 1997; Paul và cộng sự., 1993; Russell và cộng sự 1995; Sanes và cộng sự., 1986; Tavoloni., 1997). Các polycation như polybren (hexadimethrinebromide) và protamine là các chế phẩm của vec tơ virus làm tăng hiệu lực thâm nhiễm của các tế bào. Các phân tử tích điện dương này tác động như “các phân tử tiếp nhận” (adaptor’ molecules) để làm giảm lực đẩy tĩnh điện giữa các virus tích điện âm và màng tế bào cũng tích điện âm (Coelen và cộng sự., 1983; Hornby và Salmons, 1994). Tuy nhiên, polybren cũng tác động tới sự suy tàn retrovirus và có thể gây nên sự kết tụ các hạt virus vec tơ và như vậy sẽ làm cản trở sự thâm nhiễm tế bào của chúng (Andreadis và Palsso, 1997). Nhiệt độ cũng tác động tới độ chuẩn virus. Thật ngạc nhiên là các chế phẩm virus vec tơ retrovirus ở 32°C lại có độ chuẩn cao hơn (Brunnell và cộng sự ., 1995; Kotani và cộng sự., 1994). Điều đó cho thấy thời gian bán sống của virus tái tổ hợp ở 32 °C tăng 4 lần so với ở 37 °C (Kaptein và cộng sự., 1997). Độ chuẩn cũng phụ thuộc vào sự có mặt và sự dư thừa của các tế bào mã cho các phân tử receptor trên bề mặt tế bào đích. Các receptor lưỡng tính được biểu hiện trên nhiều tế bào nhưng không phải là tất cả các tế bào. Các tế bào gan không phân chia hoặc phân chia chậm có biểu hiện chút ít receptor lưỡng tính và các tế bào gốc tạo máu cũng biểu hiện chút ít receptor lưỡng tính hơn là receptor GaLV (Bunnell và cộng sự., 1995). Ngược lại receptor cho các virus có vỏ khác, hay các virus gây sưng miệng (vesicular stomatitis virus-VSV) lại có rất nhiều trên các tế bào (Coll, 1995). Protein G vỏ VSV có thể hợp nhất vào trong các hạt retrovirus, một quá trình được gọi là sao chép giả (pseudotyping) (Weiss, 1993) kết quả là làm tăng cả độ chuẩn cũng như tính ổn định của các hạt virus hơn là các protein vỏ có mang MLV (Burns và cộng sự., 1993). Những hạt MLV/VSV giả này sẽ nở rộng thêm thang vật chủ và các dạng tế bào (Friedmann và Yee, 1995). Sự chọn lọc nhanh các tế bào thâm nhiễm sơ cấp hiện nay là không thực tế bởi vì các thí nghiệm đương thời dùng các gen dấu chuẩn thường lại tác động tới sự biến thiên của tế bào. Ngay cả việc phân loại tế bào cho sự biểu hiện β – galactosidase khi dùng loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorter-FACS) cũng hết sức khó khăn vì để ổn định độ nén tế bào đòi hỏi phải cung cấp cơ chất cho các tế bào. Với sự chọn lọc bằng kháng kháng sinh lại đòi hỏi phải nuôi cấy tế bào nhiều ngày trước khi loại trừ các tế bào chết do không được truyền gen kháng kháng sinh, mặc dầu hiện nay người ta đã phát triển được một thử nghiệm phát hiện nhanh G418 (Byun và cộng sự., 1996). Gần đây một dấu chuẩn gen mới đã được sử dụng trong các vec tơ retrovirus, nó tạo điều kiện cho việc chọn lọc FACS mà không có bất cứ độc tính tế bào nào. Gen này mã cho protein huỳnh quang xanh (green fluorescent protein- GFP) chúng phát ra một ánh sáng xanh dưới vùng cực tím (Chalfie và cộng sự., 1994). Các gen GFP sẽ được công nghệ hóa để biểu hiện tốt hơn trong các tế bào động vật, các gen hGFP và EGFP đã được cài vào các vec

tơ retrovirus (Klein và cộng sự., 1997; Muldoon và cộng sự., 1997) và được dùng để xác định nhanh chóng các tế bào thâm nhiễm.



Hình 4.7 Các polycation tạo thuận lợi cho sự thâm nhiễm. Virus và các tế bào tích điện âm được các polycation như polybrene làm trung hòa lực đẩy tĩnh điện giữa 2 cấu trúc này do đó tạo thuận lợi cho sự thâm nhiễm.

(Theo walter H. Gunzburg và Brian Salmons. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

Sự chọn lọc nhanh chóng các tế bào thâm nhiễm sơ cấp tới nay là không thực tế bởi vì các thí nghiệm đương thời dùng các gen dấu chuẩn thường lại tác động tới sự biến thiên của tế bào. Ngay cả việc phân loại tế bào cho sự biểu hiện β -galactosidase khi dùng loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorter-FACS) cũng hết sức khó khăn vì để ổn định áp suất tế bào đòi hỏi phải cung cấp cơ chất cho các tế bào. Với sự chọn lọc bằng kháng kháng sinh lại đòi hỏi phải nuôi cấy tế bào nhiều ngày trước khi loại trừ các tế bào chết do không được truyền gen kháng kháng sinh, mặc dầu hiện nay người ta đã phát triển được một thử nghiệm phát hiện nhanh G418 (Byun và cộng sự., 1996). Gần đây một dấu chuẩn gen mới đã được sử dụng trong các vec tơ retrovirus, nó tạo điều kiện cho việc chọn lọc FACS mà không có bất cứ độc tính tế bào nào. Gen này mã cho protein huỳnh quang xanh (green fluorescent protein- GFP) chúng phát ra một ánh sáng xanh dưới vùng cực tím (Chalfie và cộng sự., 1994). Các gen GFP sẽ được công nghệ hóa để biểu hiện tốt hơn trong các tế bào động vật, các gen hGFP và EGFP đã được cài vào các vec tơ retrovirus (Klein và cộng sự., 1997; Muldoon và cộng sự., 1997) và được dùng để xác định nhanh chóng các tế bào thâm nhiễm.

4.7 Các vec tơ lentivirus

Các vec tơ đi từ MLV cũng giống như các MLV đều bị giới hạn thâm nhiễm với các tế bào đang phân chia bởi vì phức hợp tiền hợp nhất gồm có DNA virus và integrase không đi qua được màng nhân (Lewis và Emerman, 1994; Roe và cộng sự., 1993). Ngược lại, các lentivirus như HIV và virus gây thiếu hụt miễn dịch trên khỉ (simian immunodeficiency virus-SIV) lại có khả năng thâm nhiễm các tế bào không ở giai đoạn đang phân chia (Stevenson, 1996). Sở dĩ như vậy là do sự dư thừa các tín hiệu định vị nhân cả trong các protein MA của HIV (Bukrisky và cộng sự., 1993) cũng như trong các sản phẩm phụ của gen HIV gắn với protein MA (Heinzinger và cộng sự., 1994). Do đặc tính này của lentivirus nên người ta đã nghĩ tới việc xây dựng một hệ thống vec tơ với cơ sở lentivirus để chuyển gen tới các tế bào đang ở trạng thái bất động hoặc đã phân hóa. Trước hết, các thành viên retrovirus tiểu họ này như HIV không thể chấp nhận là các xe tải vận chuyển gen bởi vì chúng có khả năng gây nên trạng thái thiếu hụt miễn dịch. Tuy nhiên, nếu hệ vec tơ đó này được phát triển thì cũng khó dẫn đến việc sản xuất ra các HIV có khả năng sao chép cao. Nhưng các thành phần của virus cần để tạo nên các hạt vec tơ thì không chỉ có liên quan tới việc gây nên thiếu hụt miễn dịch mà còn gây ra các hiệu ứng khác chẳng hạn như kích thích đáp ứng tự miễn. Thuận lợi thứ hai để có thể tạo ra được các hệ vec tơ trên cơ sở lentivirus là cho tới nay chưa có bằng chứng nào về gây đột biến ghép bởi các virus này, mặc dầu chưa hiểu lý do tại sao điều đó lại không xảy ra.

Có nhiều nhóm nghiên cứu đã thiết lập được các vec tơ cơ sở HIV và chẳng có gì đổi mới, các hệ thống này sử dụng các protein vỏ từ các virus khác chứ không phải là HIV rồi làm giảm khả năng tái tổ hợp và tạo nên các virus thâm nhiễm. Protein G của VSV và Env lưỡng tính của MLV đều được dùng như những vec tơ lentivirus giả. Người ta đã thông báo rằng các vec tơ HIV giả với protein vỏ của MLV hoặc VSV lưỡng tính có thể cho độ chuẩn tới 10^7 cfu/ml (Naldini và cộng sự., 1996; Page và cộng sự., 1990; Reiser và cộng sự 1996) hoặc $\sim 10^5$ cfu/ml với protein vỏ của virus gây bệnh bạch cầu tế bào T trên người (human T-cell leukaemia virus- HTLV) (Landau và cộng sự., 1991). Các gen phụ trợ HIV (chẳng hạn như *vpr*, *vpu* và *nef*) đã làm bất hoạt vec tơ HIV, điều đó góp phần làm an toàn cho các vec tơ này (Reiser và cộng sự., 1996). Mặt khác, một số sản phẩm gen chẳng hạn như *Nef* mặc nhiên đã được thừa nhận là làm tăng tính thâm nhiễm của virion và như vậy nó có lợi cho các vec tơ này (Naldini và cộng sự., 1996). Cũng phải một thời gian dài người ta mới hiểu được rằng các retrovirus (và các vec tơ retrovirus) bị bất hoạt trực tiếp bởi bộ thể trong huyết thanh người (Welsh và cộng sự., 1975). Người ta đã chứng minh được rằng sự bất hoạt qua trung gian bộ thể không phải là sự tiêu tố (non-lytic) và nó phụ thuộc cả vào retrovirus trên các tế bào mà từ đó virus được sản sinh ra. Người ta sử dụng các dòng tế bào người theo thiết lập chẳng hạn như 293 (Pear và cộng sự., 1993) hoặc HT1080 (Cosset và cộng sự., 1995) để kiến tạo các tế bào đóng gói nhằm giảm nhẹ các vấn đề gây nên bởi bộ thể. Cuối cùng, con đường bộ thể cũng có thể được ức chế bởi các kháng thể đơn dòng với các thành phần đặc hiệu của bộ thể (Rother và cộng sự., 1995). Các vec tơ lentivirus cơ sở HIV ít bị ảnh hưởng do sự bất hoạt qua trung gian bộ thể hơn là các vec tơ đi từ MLV.

4.8 Viễn cảnh và kết luận

Các vec tơ retrovirus là những vật chuyển gen thông dụng nhất trong gen trị liệu lâm sàng, tính đến tháng 6 -1996 đã có 969 bệnh nhân được trị liệu với vec tơ này (Marcel và Grausz, 1996). Tuy nhiên, mới chỉ vài năm gần đây các vec tơ retrovirus vẫn chưa xây dựng được nền móng vững chắc trong khi đó các vec tơ adenovirus lại có độ chuẩn và phổ thâm nhiễm cao hơn. Nhưng với các thành tựu đương thời thì người ta lại quan tâm nhiều hơn tới các vec tơ retrovirus. Những thành tựu đã đạt được là (i) cải tiến nâng cấp mô hình thiết kế chung, (ii) đã thiết lập được các vec tơ cở sở lentivirus, (iii) đã thấu hiểu hơn về tính ổn định và sự sản sinh retrovirus, do đó hy vọng sẽ tạo được độ chuẩn cao hơn và (iv) các hệ thống vec tơ an toàn hơn đảm bảo chắc chắn rằng không sản sinh ra các virus sao chép cao. Tuy nhiên vẫn chưa thể đòi hỏi về một vec tơ retrovirus hoàn thiện và có lẽ phải phấn đấu nhiều nữa mới có được thành quả đó. Hệ thống vec tơ tổng hợp nhân tạo sẽ giải quyết được nhiều vấn đề có liên quan đến hệ thống vận chuyển như hiện nay. Nhưng chắc chắn trong tương lai trong thành phần của retrovirus sẽ có cả hệ thống vec tơ nhân tạo.

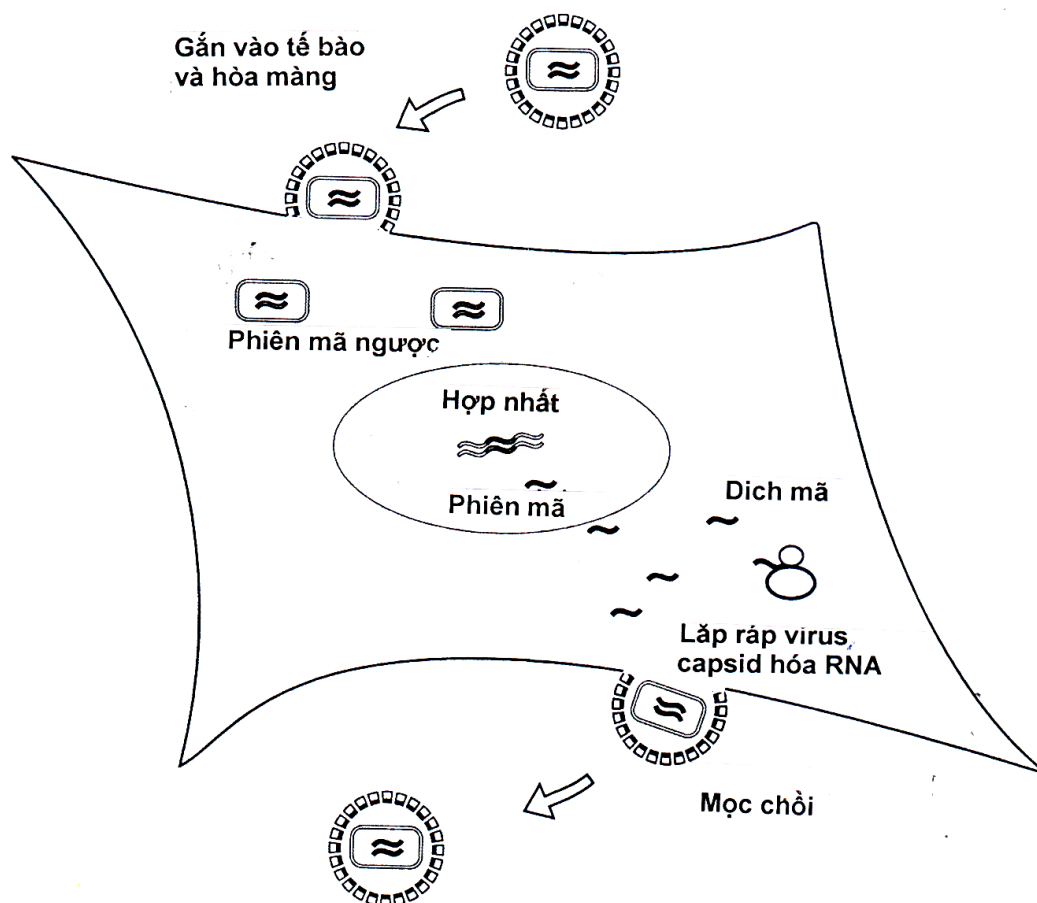
Chương V

CÁC VEC TƠ LENTIVIRUS

5.1 Mở đầu

Lentivirus là một phân họ của retrovirus, chúng thâm nhiễm cả động vật cao cấp cũng như các động vật khác. Đặc trưng của chúng là hướng động tới các tế bào bạch cầu đơn nhân (monocyte) và đại thực bào (macrophage). Virus của các động vật khác (không phải động vật cao cấp) thâm nhiễm các vật nuôi, virus maedi visna (MVV) thâm nhiễm cừu, virus gây viêm não của dê (caprine arthritis encephalitis virus –CAEV) thì thâm nhiễm cho dê và các virus gây bệnh thiếu máu cho ngựa (equine infectious anaemia virus – EIAV) thì thâm nhiễm cho ngựa. Gần hơn là virus gây thiếu hụt miễn dịch của bò (bovine immunodeficiency virus – BIV) và virus gây thiếu hụt miễn dịch trên mèo (feline immunodeficiency virus – FIV) thì thâm nhiễm các thú nuôi và mèo. Các virus type I và type II (HIV-1 và HIV-2) gây thiếu hụt miễn dịch (THMD) trên người. Lentivirus và các virus gây THMD trên khỉ (simian immunodeficiency virus – SIV) thì thâm nhiễm cho người và khỉ, nó hướng vào các tế bào lympho. HIV-1 và HIV-2 gây bệnh AIDS ở người. Người ta thấy có mối liên hệ chặt chẽ giữa SIV và các phân dòng, theo các phân dòng và vật chủ thì nó có thể gây được bất kỳ triệu chứng nào giống như hội chứng thiếu hụt miễn dịch – AIDS. Mặc dầu đã phát triển được nhiều lentivirus không phải của động vật cao cấp như FIV và EIAV với tư cách là các vec tơ retrovirus, nhưng cho tới nay mới chỉ thu được những tiến bộ nhỏ với các virus như HIV-1, HIV-2 và SIV. Trong chương này chúng ta sẽ đề cập những kiến thức hiện đại về các vec tơ cơ sở HIV cùng với những chi tiết về SIV và các chimera virus.

Chu kỳ sống của retrovirus được phác thảo trên (Hình 5.1). Lentivirus là các retrovirus phức hợp với các mẫu RNA nối nhiều tầng (multiple spiced RNA species) cùng với nhiều protein nhỏ với chức năng điều hòa, nó cho phép kiểm soát sự sao chép phức tạp của virus ở các pha sớm và muộn trong chu kỳ sống của chúng.



Hình 5.1 Chu kỳ sống của một retrovirus đặc biệt gây nhiễm tế bào, ở đây có sự chuyển đổi RNA hệ gen thành DNA sợi kép và hợp nhất vào nhiễm sắc thể của tế bào bởi quá trình phiên mã, protein virus lắp ráp với capsid và sự nảy chồi của virus.

(Theo Andrew M.L.Lever. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

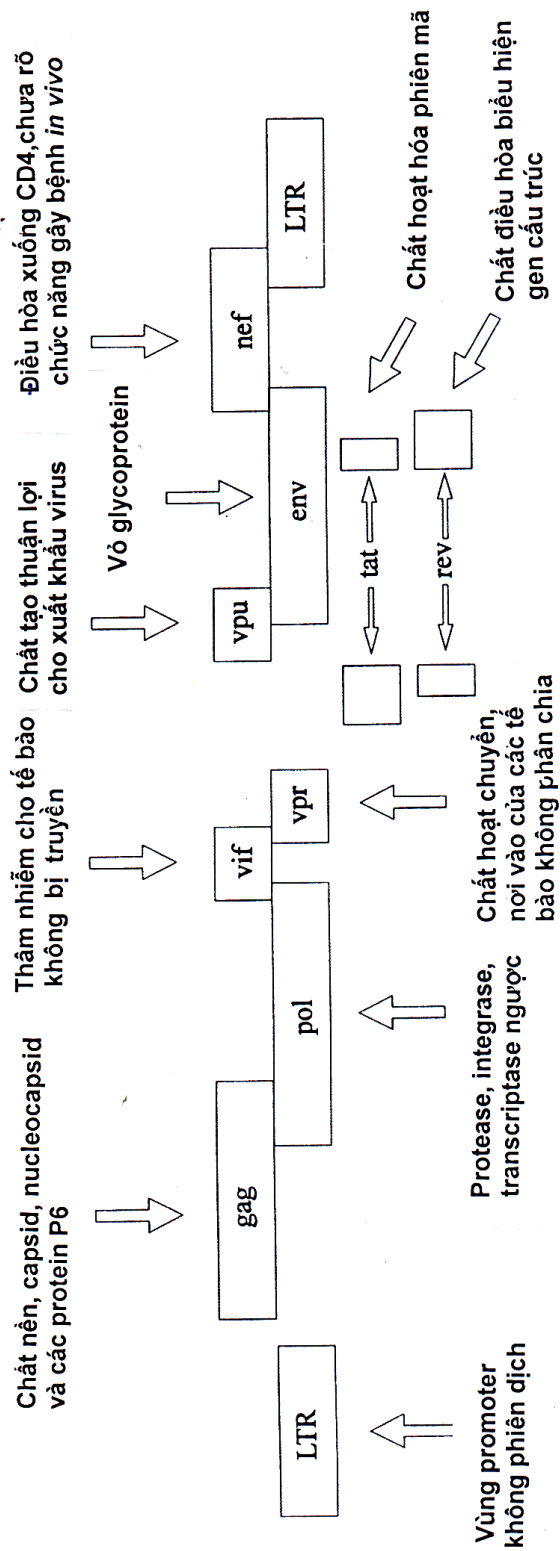
5.2 Cấu trúc gen của các lentivirus

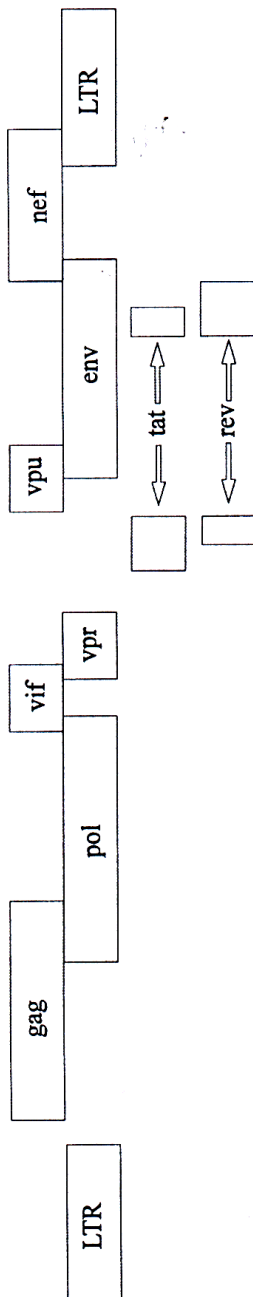
Phần bố cấu gen và mẫu RNA ghép nối của HIV giống như là một nguyên mẫu lentivirus được chỉ rõ ở Hình 5.2 và 5.3. Ở provirus, đầu 3' và 5' có các đoạn lặp tận dài đồng nhất (identical long terminal repeat- LTR), những vùng không mã có các trình tự tác động *cis* quan trọng. Có 3 khung đọc mở chính: *gag* mã cho các protein capsid của virus, *pol* mã cho enzyme virus và *env* mã cho glycoprotein lớp vỏ. Khi sử dụng HIV như một nguyên mẫu thì gen *gag* và *pol* được mã trên phần thông tin virus không ghép nối. Polyprotein Gag khởi đầu được tổng hợp như một tiền thân Pr55, sau đó được protease của virus cắt bỏ ít nhất 4 đoạn. Sự cắt bỏ này xảy ra khi đang hoặc sau khi nảy chồi. Đa số các đoạn tận N đều là các protein chất nền (matrix protein-MA) mà ở các hạt virus thì nó có liên quan tới việc neo protein vỏ vào virion. Khi virus vào trong tế bào thì MA có liên quan tới việc đưa phức hợp hợp nhất tới nhân tế bào và cho phép provirus hợp nhất trong các tế

bào không ở giai đoạn đang phân chia. Tín hiệu định vị nhân giả định được xác định bằng trình tự amino acid của nó. Đầu tận C đối với MA là capsid (CA), đó là một protein cấu trúc phần lõi virus. Nó cũng là một protein nhận dạng trong một số phản ứng ELISA của các hạt virus (p24 trong HIV-1). Nó đáp ứng cho việc hợp nhất cấu trúc phần lõi virus. Protein p9 hay protein nucleocapsid (nucleocapsid protein – NC) là sản phẩm đoạn thứ 3 của *gag*. Nó có mẫu thiết kế CCHC giống 2 ngón tay và có liên quan tới việc bọc RNA hệ gen bên trong virus để tránh bị hủy hoại. Protein này cũng tạo thuận lợi cho việc phiên mã ngược của RNA virus. Những công trình gần đây chứng minh rằng peptide “chêm” P2 giữa CA và NC có thể ảnh hưởng tới sự capsid hóa RNA. Hầu hết các đoạn tận C của *gag* là p6, nếu nó bị đột biến sẽ dẫn tới sự khiếm khuyết các nhân tố kết thúc sự đâm chồi của virus từ tế bào. Tuy nhiên cơ chế chính xác về sự ảnh hưởng tới các giai đoạn chót của sự lắp ráp và đâm chồi của virus thì vẫn chưa rõ, mặc dầu nó có thể có liên quan tới sự tương tác với các protein của tế bào.

Hình 5.2 Phần bố cấu gen của HIV như là một lentivirus nguyên mẫu hiện rõ các khung đọc chính và chức năng của các sản phẩm gen (trang bên)
(Theo Andrew M.L.Lever. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

Hình 5.3 Sơ đồ họ các phân tử mRNA từ provirus gồm 3 nhóm: không ghép nối, ghép nối đơn và đa ghép nối (trang bên)
(Theo Andrew M.L.Lever. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).





Các mẫu mRNA

Không ghép nối _____ gag, pol

Ghép nối đơn _____ env, nef

Ghép nối đa _____ tat, rev, etc.

Các sản phẩm của gen *pol* đầu tiên như là một protein hòa trộn Gag/pol. Trong trường hợp HIV thì xảy ra sự xê dịch khung khi phiên dịch (tổng hợp protein) về phía khung đọc mở *gag*, kết quả là ribosome bắt đầu dịch ở khung đọc *pol*. Protein hòa trộn (fusion protein) được tạo ra từ một tiền thân Pr160 gag/pol. Các sản phẩm của gen *pol* còn bao gồm cả tận N, protease (PR) – phân cắt protein gag và gag/pol thành những bộ phận cấu trúc của chúng, enzyme phiên mã ngược – đáp ứng việc chuyển đổi hệ gen RNA thành phân tử DNA sợi kép và integrase (INT) – có khả năng cài provirus sợi kép vào trong nhiễm sắc thể của tế bào, nó phụ thuộc vào các trình tự nhận biết đặc hiệu trong LTR của virus. Protein env thì được phiên dịch từ một RNA ghép nối đơn. Ở đây vật cho ghép chính nằm ở vùng 5'*gag* không được phiên dịch và vật nhận ghép *env* lại nằm ở phía trên mã khởi đầu của *env*. Bản phiên mã ghép nối đơn cũng mã cho *nef*. Khi protein env được tổng hợp thì trước tiên nó tạo ra một tiền thân gp160 trên lưới nội chất (ER) gắn với ribosome. Gp160 sẽ tổng hợp ở khoang lưới nội chất, sau đó được xử lý bằng protease của tế bào để trở thành chất vận chuyển màng gp41 (transmembrane gp41- TM) và một protein bề mặt gp120 (surface gp120 (SU) protein). Sự gắn kết này không phải là liên kết đồng hóa trị mà phức hợp này phải trải qua quá trình glycosyl hóa và sau đó ra bề mặt tế bào với kết cấu là một phức hợp gồm 3 hay 4 thành phần.

Hơn nữa, HIV còn có nhiều khung đọc mở nhỏ, vì thế mà có sự tương đồng ở hầu hết các lentivirus. Tat là một chất hoạt chuyển (transactivator) mạnh đối với phiên mã, nó mã hóa các thông tin ghép nối kép hoặc hoạt động ở dạng *trans* để tăng cường khả năng biến đổi của RNA polymerase thông qua cấu trúc vòng gốc RNA được hình thành ở vùng phía trên vị trí bắt đầu phiên mã trong LTR. Điều này được hiểu như là vòng gốc đáp ứng Tat (Tat-responsive [TAR] stem loop).

Tổ hợp Tat/LTR là một trong số các promoter mạnh nhất đã biết và nó làm tăng cường sự sản xuất tất cả các mẫu mRNA virus. Khi mới thâm nhiễm, có sự bất ổn định của các trình tự (INS) trong intron của *env* (tức là *gag* và *pol*) và ngay cả trong gen *env* thì RNA thông tin dài đầy đủ cũng nhanh chóng trở thành dạng ghép nối kép, vì vậy Tat là sản phẩm chính của gen được tạo ra sớm trong chu kỳ sống nhờ sự điều hòa dương.

Protein Rev được mã bởi 2 exon gối lên nhau của Tat. Protein này cũng được tạo ra khá sớm trong chu kỳ sống và khi được tích lũy thì nó có khả năng tương tác với yếu tố đáp ứng Rev (Rev-responsive element – RRE) trong vùng mã cho *env* để tạo điều kiện cho sự xuất khẩu RNA thông tin không ghép nối và ghép nối đơn từ nhân ra tế bào chất.

Tương tác Rev/RRE đã vượt qua hiệu ứng của INS – đặc ân của sự ghép nối. Điều này giúp cho việc kiểm soát biểu hiện của RNA virus, trong đó một số lớn RNA mã cho các protein điều hòa đã được tạo ra ở pha sớm hoặc nhờ sự chuyển đổi qua trung gian Rev để tạo nên các RNA thông tin nối đơn có chiều dài đủ để mã cho các protein cấu trúc và enzyme của virus. Bốn khung đọc mở khác cũng rất đáng quan tâm. Gen *nef* ở đầu 3' của virus có rất nhiều chức năng. Mặc dầu khởi đầu xác định nó như là một chất điều hòa âm của phiên mã, nhưng thực ra nó còn có các chức năng quan trọng khác *in vivo*, trong đó có sự điều hòa làm giảm CD4 trên bề mặt các tế bào thâm nhiễm và tới nay vẫn chưa xác định được những chức năng cần thiết dẫn tới các đột biến nhỏ ở *nef* (của SIV).

Vif là một protein phụ trợ cần thiết trong một vài hệ thống thâm nhiễm tế bào. Hiệu quả của sự lan truyền từ tế bào này sang tế bào khác của virus phụ thuộc vào việc có hay không có Vif của virus. Nhiều dòng tế bào chỉ bị thâm nhiễm nếu có mặt Vif.

Những bằng chứng gần đây chứng minh rằng Vif được đóng gói trong các hạt virus và nó có thể gây tác động lên các bước sớm của sự lột vỏ virus.

Vpu có chức năng làm tăng hiệu ứng xuất khẩu virus. Sở dĩ như vậy vì thứ nhất là Vpu làm tách rời phức hợp protein vỏ và protein CD4 của tế bào thâm nhiễm, điều này xảy ra ở lưới nội chất, khi xuất khẩu protein thì cũng xuất khẩu luôn cả protein vỏ virus. Thứ 2 là Vpu có chức năng xuất khẩu khá rộng, bằng chứng là các tế bào Hela không có khả năng xuất khẩu virus hoặc các hạt Gag tự do ở vỏ là do không có Vpu.

Vpr đã được xác định là một protein có nhiều chức năng. Nó được hợp nhất vào trong các hạt virus (không giống Vpu). Khả năng hoạt hóa phiên dịch của nó kém hơn Tat. Tuy nhiên, sự có mặt của vpr tạo khả năng cho HIV hợp nhất hệ gen của nó vào trong các tế bào không ở giai đoạn đang phân chia. Nó cũng được chứng minh là gây cảm ứng để dừng chu kỳ tế bào ở G2 trong vài dòng tế bào. Vì thế viễn cảnh của các vec tơ này cũng có thể là rất to lớn và cũng có thể sẽ bị hạn chế.

5.2.1 Lợi thế của các vec tơ lentivirus

Cũng giống như tất cả các vec tơ retrovirus, lentivirus cũng cho một tiềm năng cài các gen đơn ổn định - bản phiên mã gen vào trong nhiễm sắc thể tế bào chủ và xác định được đích của sự chuyển gen trong các tế bào có các receptor virus thích hợp. Lý do chính để người ta quan tâm tới lentivirus hơn các retrovirus khác là khả năng nhắm đích vào các tế bào ở giai đoạn G0. Nhiều quần thể tế bào được chuyển gen trị liệu như gan, cơ và não thì hầu hết hoặc hoàn toàn đều ở thời điểm G0.

Lợi thế thứ 2 là khi sử dụng tổ hợp mạnh promoter Tat/LTR thì sự biểu hiện gen cao là có khả thi.

Lợi thế thứ 3 là các gen phụ trợ tạo thêm các chức năng điều hòa, tức là các gen này có thể tạo nên sự cảm ứng.

5.2.2 Những bất lợi của các vec tơ lentivirus

Những bất lợi hiển nhiên của các vec tơ cơ sở HIV là sự nguy hiểm của các sản phẩm tái tổ hợp của một virus hoang dã. Dĩ nhiên điều này chỉ có thể xảy ra nếu có mặt đầy đủ các thành phần cần thiết để kiến tạo lại đầy đủ hệ gen virus, vì vậy hệ thống này phải được thiết kế sao cho sự cố trên không được xảy ra.

Bất lợi thứ hai là hệ thống vec tơ lentivirus có độ chuẩn tương đối thấp, không hiểu lý do tại sao lại như vậy. Tuy nhiên, khi nhìn nhận vấn đề này người ta thấy rằng dường như có sự phóng đại khi so sánh trực tiếp các vec tơ lentivirus với các vec tơ của các dòng tế bào biến nạp của chuột *in vitro*. Nhìn chung các nhà nghiên cứu đều cho rằng khi đánh giá về khả năng biến nạp đối với các tế bào sơ cấp *in vitro* thì thấy rõ ràng có sự khác biệt giữa lentivirus và các vec tơ của chuột, tức là các vec tơ của chuột là kém hiệu lực hơn.

5.3 Các vec tơ cơ sở lentivirus

Hệ thống vec tơ retrovirus có 2 thành phần cơ bản: (i) hệ gen virus đã được cải biến có các gen ngoại lai với các trình tự tác động *cis* cần cho sự capsid hóa các hạt virus và cài ổn định vào các tế bào đích – vec tơ và (ii) một virus trợ giúp hoặc các cấu trúc virus cung cấp tất cả các cấu trúc ở dạng *trans* và các protein enzyme cần thiết cho việc kiến tạo một virion nguyên bản trong đó vec tơ có thể đã được đóng gói để chuyển giao.

Những thành phần tối thiểu cho một vec tơ là: tín hiệu đóng gói, nó cho phép sự capsid hóa chọn lọc RNA ở các hạt virus, vị trí gắn primer (primer binding site – PBS) dành cho sự khởi đầu phiên mã ngược, một đoạn polypurin để khởi đầu sự tổng hợp chuỗi cộng provirus (proviral plus strand synthesis) và các trình tự LTR tạo được cả promoter lẫn chức năng kích thích, các tín hiệu polyadenylate và các trình tự nhận biết cần thiết cho sự hợp nhất của provirus. Tất cả những thành phần này có thể bị bỏ sót ở hệ thống đóng gói. Ở lentivirus thì 5'LTR và vị trí gắn primer hầu như kế lên nhau và thường được cho là các trình tự nối tiếp trong vec tơ. Vị trí của tín hiệu capsid hóa Ψ ở HIV thì vẫn là một vấn đề tranh cãi. Các nghiên cứu đầu tiên đã xác định được tầm quan trọng của trình tự capsid hóa nằm giữa 5' của vật cho ghép nối (5' splice donor) và mã khởi đầu *gag*. Những đột biến ở vùng này sẽ dẫn đến khiếm khuyết đóng gói 10-1000 lần ít hơn virus hoang dã phụ thuộc tế bào. Những nghiên cứu kế tiếp đã xác định thêm một vùng khác cũng có khả năng kích thích sự đóng gói. Tuy nhiên, mỗi nghiên cứu lại đưa ra một hệ thống khác hẳn nhau, vì thế khó mà đi đến kết luận cuối cùng. Đầu 3' của gen *env*, kể cả RRE làm tăng sự đóng gói của một số cấu trúc. Vùng 5' của gen *gag* cũng được xác định nhờ nó có tín hiệu kích thích đóng gói. Tín hiệu đóng gói được chứng minh là không liên tục và có tới vài dạng khác nhau. Trình tự tối thiểu hay trình tự cần cho sự đóng gói thì vẫn chưa được xác định. Tuy nhiên, trong một số trường hợp đầu 3 của *env*, toàn bộ *gag* và vùng TAR là không cần thiết cho sự đóng gói ở vùng mà giữa vật cho ghép nối và *gag* ATG có ảnh hưởng lớn nhất. Một trình tự pentanucleotide GGNGR thường thấy ở vùng tín hiệu đóng gói của các lentivirus của các động vật cao cấp. Trong thực tế, nhiều vec tơ có vùng 5' đầy đủ từ vị trí bắt đầu phiên dịch, xuyên qua phần bắt đầu đi vào phần đầu tiên của gen *gag* cùng với đầu 3' của *env*. Ở phần thứ 2 có thể bao gồm các tín hiệu đóng gói tách biệt hoặc các trình tự không ổn định khi hợp nhất đầu 5' của gen *gag* vào trong cấu trúc này (Hình 5.6)

5.3.1 Các ảnh hưởng khác đối với sự đóng gói

Sự đóng gói RNA trong HIV khá lộn xộn và ít hiệu quả hơn so với các hệ retrovirus của khỉ và chuột. Một vài tài liệu đã chứng minh khả năng của HIV đối với sự capsid hóa RNA ghép nối với cả dẫn xuất virus cũng như các vec tơ với hiệu ứng cao, mặc dầu so với thông tin không ghép nối dài đủ (full-length unpliced message) thì thấp hơn. Cũng chưa rõ là liệu kết quả này có phải là do sự hình thành heterodimer giữa các mẫu ghép nối và các mẫu đủ độ dài hay không. Dĩ nhiên có nhiều yếu tố ảnh hưởng tới vấn đề này. Trong một số dạng được dùng cho sự thâm chuyển tức thì, chẳng hạn như các tế bào Cos thì thấy sự đóng gói nhiều RNA ghép nối, có thể là do nồng độ của mẫu này ở tế bào là cực kỳ cao. Sự đóng gói ở lympho T thì đặc hiệu hơn mặc dầu vẫn phát hiện thấy RNA ghép nối trong các hạt virion. Khi sử dụng các kỹ thuật thâm chuyển không có dòng tế bào nào được chỉ ra là có RNA đáp ứng đầy đủ cho việc capsid hóa. Điều đó có thể do mục đích của sự thâm nhiễm là muốn có sự biểu hiện cao với một thời gian ngắn do đó dẫn đến sự bão hòa hàm lượng RNA trong tế bào trong hệ thống. Trong các thí nghiệm thiết kế tín hiệu đóng gói thì các quy trình thâm nhiễm có liên quan tới tính đặc hiệu cao của sự đóng gói. Trùng hợp với vấn đề này là các quan sát thấy rằng nếu sự đóng gói mà không gắn với việc cắt bỏ một đoạn nhỏ ở đầu 5' thì có sự thâm nhiễm cao hơn. Ở HIV-2 đã được chứng minh là có sự phân cấp tính đặc hiệu đóng gói trong đó sự đóng gói ở các tế bào

Cos thì tính đặc hiệu là thấp hơn các tế bào T, tức là tế bào T dễ bị thâm nhiễm hơn tế bào Cos.

Ngay cả trong các dòng tế bào đóng gói cơ sở HIV thì cũng có bằng chứng cho thấy RNA ghép nối từ một cấu trúc provirus hợp nhất vẫn có thể đi vào lộ trình đóng gói và được hợp nhất trong các virion. Nếu là *in vivo* thì trước tiên nó gây bất lợi cho virus mà lẽ ra RNA ghép nối đã có thể hoàn tất sự đóng gói với hệ gen có độ dài mong muốn. Hơn nữa, chỉ với sự lộn xộn nhỏ cũng làm tác động tới việc kích thích tái tổ hợp capsid hóa heterodimer và nó có khả năng làm tăng sự đa dạng của virus. Cũng còn khả năng khác là hệ thống này đã được xem xét dưới các điều kiện nhân tạo và tính đặc hiệu có thể phụ thuộc vào sự khác nhau về lượng RNA cần cho sự capsid hóa khi đang lắp ráp các capsid virus. Lentivirus phải trải qua sự chuyển đổi biểu hiện gen từ sớm sang muộn, điều đó có thể trùng hợp với việc tăng RNA không ghép nối trong tế bào chất cùng với các protein cấu trúc được tạo ra để làm cân bằng nhằm chống lại việc đóng gói RNA đa ghép nối sớm gây nên sự dư thừa trong chu kỳ sống.

Trong thực tế, cho tới nay chưa có dòng tế bào nào thỏa mãn với việc loại trừ sự capsid hóa của các RNA ghép nối. Những dòng tế bào lympho có vẻ khá hơn các dòng tế bào biểu mô và các tế bào giống như nguyên bào sợi. Tuy nhiên, vẫn chưa có đủ các công trình nghiên cứu về các dòng tế bào để ra lời khuyến cáo.

Một khuynh hướng xa hơn nữa đi từ các quan sát thấy rằng HIV-1 có thể đóng gói được các vec tơ cơ sở HIV-1 và HIV-2. Nhưng HIV-2 thì chỉ đóng gói được các vec tơ HIV-2. Điều đó dẫn đến HIV-2 được ưu tiên cho đóng gói RNA tịnh tiến (co-translationally), vì thế mà hạn chế được khả năng lựa chọn RNA vec tơ dị loại dạng *trans*. Khả năng của HIV-1 đóng gói được vec tơ có thể là do giảm sự phụ thuộc của nó đối với sự đóng gói ở dạng *cis*. Vì vậy khả năng tác động của nó với tư cách là một hệ thống đóng gói các RNA khác (Kaye và Lever).

Có những điều khó hiểu không giải thích được với các gen dị loại trong việc đóng gói ở một số trường hợp. Chẳng hạn như gen chloramphenicol acetyl transferase (CAT) capsid hóa cực kỳ hiệu quả các hạt virion khi nó nằm trong hệ gen như một thành phần thay thế gen *nef* hoặc nằm chính giữa một gen của vỏ đã bị loại trừ. Gen CAT trong vùng *gag* cũng có hiệu ứng âm đối với sự capsid hóa, có thể là do khoảng cách giữa các trình tự dị loại và tín hiệu đóng gói quá gần do đó ảnh hưởng tới cấu trúc bậc 2 của tín hiệu đóng gói.

Mục tiêu của một hệ thống vec tơ là chuyển giao một gen dị loại tới một dòng tế bào đích. Có nhiều phương pháp liên quan tới HIV đã được thử nghiệm nhằm thay thế gen virus trợ giúp sao chép cao ở các cấu trúc tách biệt được thiết kế truyền thống để giảm tối đa hoặc loại bỏ hoàn toàn sự phát sinh virus sao chép cao. Sự chuyển gen khi sử dụng lentivirus với vỏ virus nguyên bản được tóm tắt ở Bảng 5.1

5.3.2 Chuyển gen trực tiếp

Thực hiện đầu tiên về sự chuyển gen trực tiếp là thay thế gen dị loại (CAT) cho khung đọc mở *nef* của HIV đủ độ dài (full-length HIV) (Hình 5.4). Một dãy các cấu trúc CAT với các chiều dài khác nhau được cài vào đầu 3' của virus và một số cấu trúc không làm ảnh hưởng tới năng lực sao chép. Khi chuyển hệ gen đủ độ dài với nguyên bản gen CAT tới các tế bào đích thì gen CAT có lẽ là từ một bản phiên mã ghép nối. Trong các thí nghiệm *in vitro* năng lực sao chép của virus bị giảm xuống khi kích cỡ của gen cài vào tăng lên. Điều đó hoàn toàn có lý bởi vì muốn tăng kích cỡ của bản phiên mã đủ độ dài thì bắt buộc

phải gia tăng đóng gói. Mặc dầu đã có bằng chứng rằng RNA hệ gen có đủ độ dài lớn hơn nữa vẫn có thể được đóng gói (McCann và Lever), nhưng trong thực tế vẫn chưa phân tích được kích cỡ tối thiểu của RNA có thể “vừa khít” trong một lentivirus. Khi cài một gen CAT nhỏ nhất, năng lực sao chép của virus *in vitro* thực tế là có tăng lên đôi chút so với dạng hoang dã, có lẽ là do *nef* đã bị loại trừ - chính nó đã có hiệu ứng ức chế nhỏ đối với sự sao chép của virus *in vitro*. Vì thế, chuyển giao một dấu chuẩn gen có lẽ là hệ hiệu lực nhất. Tuy nhiên, tính độc hại của HIV thì vẫn không thể nào coi thường được.

5.3.3 Virus trợ giúp trung gian

Theo các nghiên cứu sớm hơn, khi sử dụng HIV với các trình tự tác động chính xác *cis* để phân tích sự biểu hiện ổn định của các vec tơ test thì người ta đã sử dụng dòng tế bào có CD4 dương tính. Những tế bào này đã bị nhiễm HIV dạng hoang dã và phần dịch nổi từ môi trường nuôi cấy đã được phân tích bởi RNA slot blot và độ chuẩn vec tơ được đo bằng sự chuyển gen tới một quần thể thứ 2 của những tế bào có CD4 dương tính (Hình 5.5). Khi sử dụng một vec tơ như thế thì vec tơ sẽ có độ chuẩn là 10^3 và 10^4 cfu/ml (số đơn vị khuẩn lạc tạo thành trên một mililit). Bởi vì bản chất của hệ thống này là sự hiện diện của một virus trợ giúp dạng hoang dã.

5.3.4 Các hệ thống cộng nhiễm

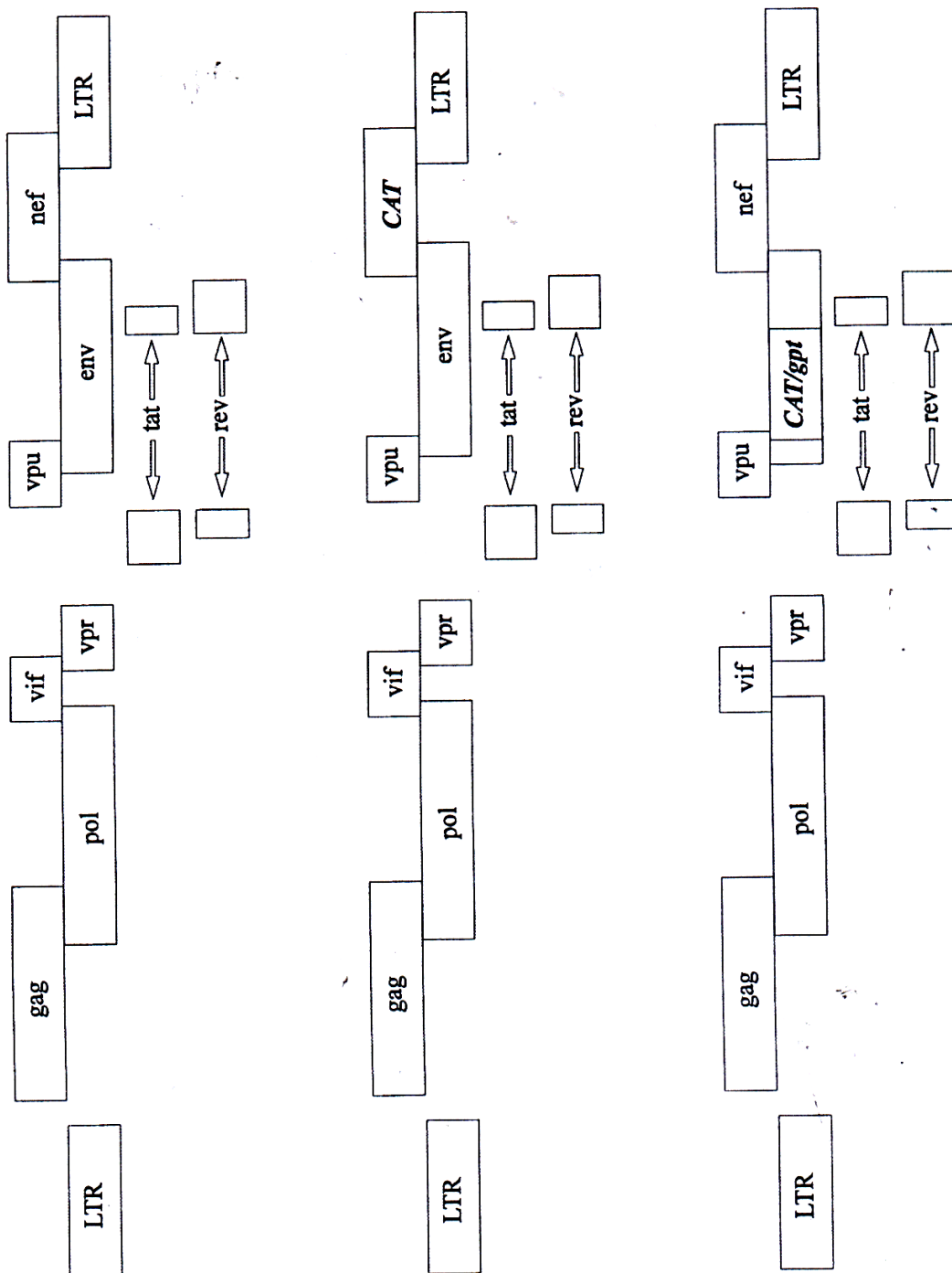
5.3.4.1 Bổ sung vỏ

Về mặt phương pháp, đó là một vec tơ đơn có sử dụng một số nhóm của phần bổ trợ *env*. Ở đây một gen dị loại được đưa vào giữa khung đọc mở *env* (Hình 5.4). Các khung đọc mở cho các protein phụ trợ Tat và Rev thì vẫn giữ nguyên. Gen dị loại được cài vào là một dấu chuẩn gen như CAT hoặc *l*-galactosidase. Plasmid này sau đó nhiễm vào tế bào cùng với gen biểu hiện vỏ để tạo nên các hạt virus trong đó RNA đủ dài có chứa gen dị loại ở vùng vỏ đã được bọc trong capsid. Plasmid này đặc biệt mạnh, khi nghiên cứu với chính protein vỏ (thường được dùng để phân tích chức năng của sự đột biến vỏ) thì thấy có một phần ngoài vòng đọc của virus lọt vào trong quần thể tế bào đích. Điều này cũng được áp dụng trong nghiên cứu bệnh lý học, trong đó hệ thống có động học sao chép đơn – tròn có thể chuyển giao được các gen dị loại thích hợp. Nó cũng có khả năng cung cấp thông tin về các vấn đề này vì quần thể tế bào thứ nhất có thể ảnh hưởng dễ dàng tới sự thâm nhiễm của virus thông qua các cách thâm nhiễm khác nhau. Ở phần gối nhau giữa các trình tự của vỏ trong 2 cấu trúc thì tăng cao độ tái tổ hợp và tái sinh virus dạng hoang dã đủ độ dài. Vì thế, hệ thống này không được áp dụng *in vivo* đối với người. Tuy nhiên, trên các mô hình ở động vật thì người ta lại dùng các lentivirus khác như visna và SIV, những virus này có giá trị trong việc nghiên cứu thâm nhiễm và bệnh lý học.

5.3.4.2 Sự cộng nhiễm khi sử dụng vec tơ độc lập và các cấu trúc đóng gói

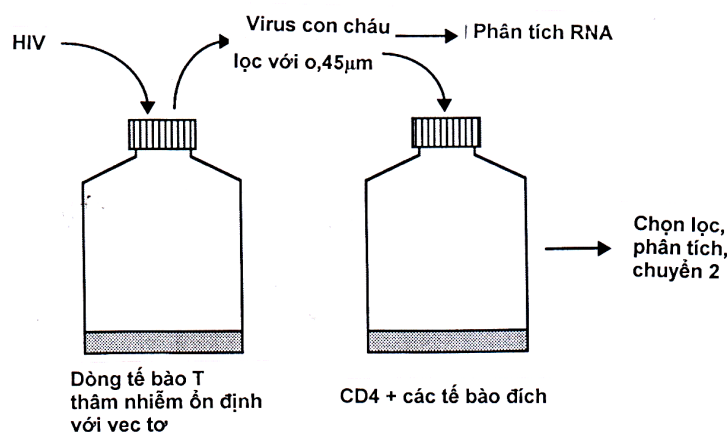
Một vài nhóm nghiên cứu đã công bố các số liệu thực hiện được cũng như hiệu lực của hệ thống này. Nhiều cấu trúc DNA tách biệt đã được cộng nhiễm vào trong tế bào cùng với cấu trúc đóng gói cộng vec tơ (2 thành phần) và với cấu trúc đóng gói bổ trợ công vec tơ (3 thành phần) (Hình 5.6). Trong trường hợp thứ nhất, hệ thống được thiết kế nhằm

giảm thiểu tối đa các trình tự trong vec tơ và các cấu trúc đóng gói bằng cách loại bớt đi LTR ở các cấu trúc đóng gói hay làm đột biến trình tự tín hiệu đóng gói ở đầu 5', rồi đi nguyên xi những khung đọc mở và các tín hiệu ghép nối thích hợp. Khi sử dụng hệ thống này phải có sự chuyển đổi tự do của các tế bào dương tính với CD4 với độ chuẩn 10^2 cfu/ml. Điều quan trọng là nó không được kém hơn hệ thống vec tơ trên chuột khi đánh giá song song. Cộng nhiễm với 2 plasmid có sự gối lên nhau giữa vec tơ và virus trợ giúp, virus sao chép cao tất yếu là luôn được tạo ra ngay cả khi các trình tự tín hiệu đóng gói đã được loại khỏi virus trợ giúp. Thậm chí khi loại bỏ 35 cặp base trong các cấu trúc đóng gói/ trợ giúp (phần cấu trúc này có hiệu ứng ức chế cao đối với sự đóng gói ở các tế bào T) thì vẫn chưa đủ để phòng ngừa sự tái tổ hợp. Những điểm yếu của hệ thống cộng nhiễm là hiệu ứng biểu hiện, hay sự lộn xộn của các tế bào được sử dụng (qua các nghiên cứu về đóng gói), hay RNA lại loại trừ những trình tự đóng gói quan trọng dạng *cis*. Sự tái tổ hợp giữa các heterodimer trong khi phiên mã ngược sau khi thâm nhiễm tế bào đích có lẽ sẽ tạo ra virus sao chép cao.



Hình 5.4 Những thay đổi trong việc cài các gen dị loại vào trong cấu trúc provirus. Phần trên cùng chỉ các provirus nguyên bản, phần giữa cho thấy các gen CAT đã được cài vào gen nef, đây là phần sao chép cao. Phần thứ 3 chỉ CAT hoặc gpt đã được cài vào gen của vỏ. Sự bổ sung này cần để biểu hiện vỏ.

(Theo Andrew M.L.Lever. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

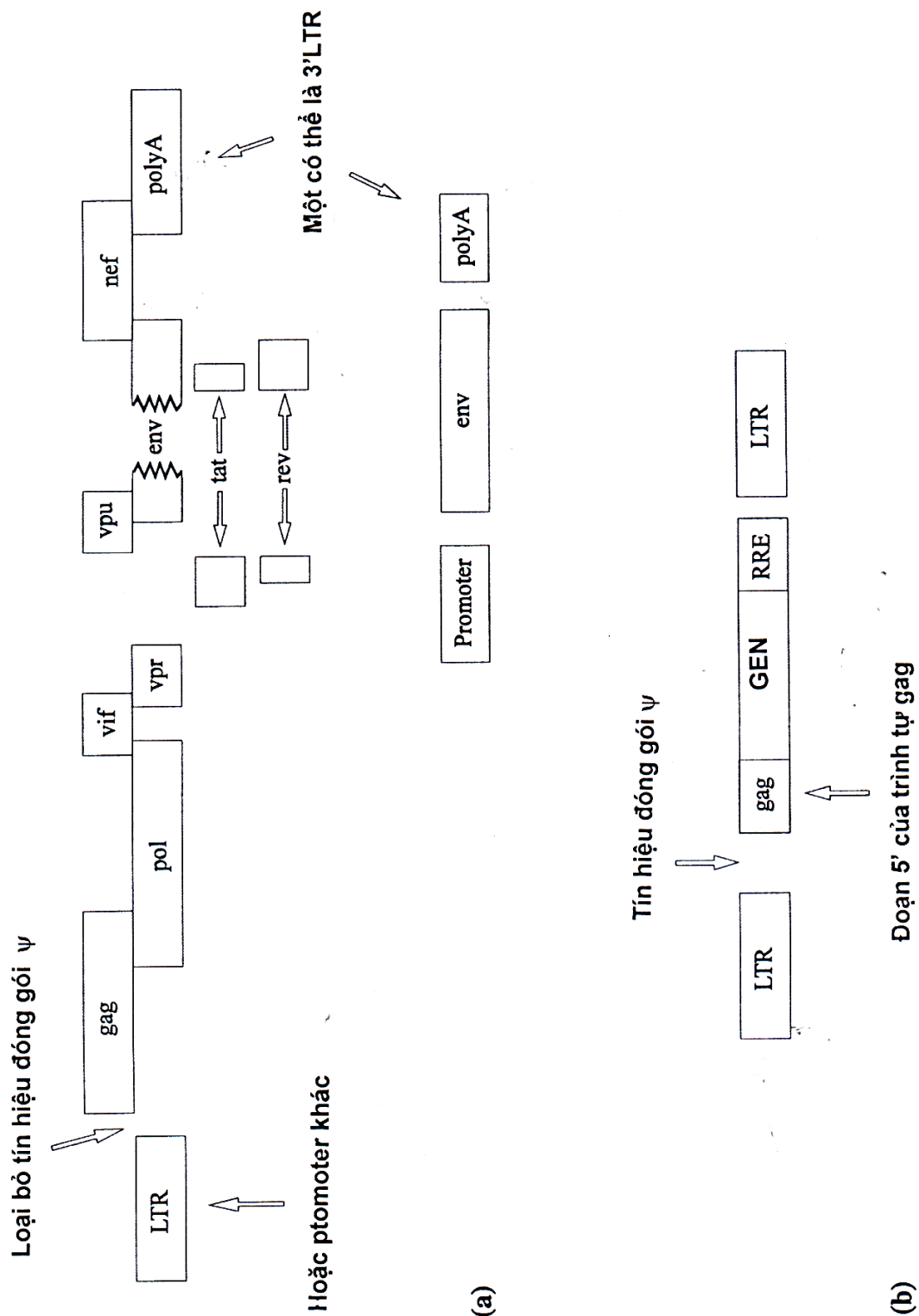


Hình 5.5 Sự chuyển gen qua trung gian virus trợ giúp được sử dụng hữu hiệu trong các nghiên cứu về sự capsid hóa.

(Theo Andrew M.L.Lever. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

5.3.4.3 Cộng nhiễm với 3 plasmid

Những thí nghiệm về nhiễm tức thời với 3 plasmid mà không nảy sinh virus sao chép cao đòi hỏi phải có ít nhất 2 sự kiện tái tổ hợp giữa 3 cấu trúc. Cấu trúc vỏ thường từ một promoter dị loại hoặc một LTR loại thải và phải có một tín hiệu polyadenylat hóa dị loại. Cho tới nay, cả LTR của HIV và promoter dị loại đều được sử dụng để tạo ra các protein Gag/pol. Chất biểu hiện vỏ thường có một promoter dị loại. Độ chuẩn cực đại theo các tài liệu cho tới nay về cộng nhiễm là 10^3 cfu/ml. Nhiều tài liệu lại cho các số liệu thấp hơn đôi chút, chỉ vào khoảng 10^2 cfu/ml. Một số tài liệu trước lại công bố với số liệu cực kỳ cao (10^5 cfu/ml). Hệ thống này phụ thuộc đặc biệt vào số tế bào đã thao tác thành thạo DNA thâm nhiễm và dung nạp với một nồng độ tương đối cao DNA thâm nhiễm, chẳng hạn như Cos-1. Theo lý thuyết thì không có lý do gì mà những dòng tế bào có thể biểu hiện một cách ổn định với bất kỳ một trong số 3 plasmid lại không được sử dụng vì nó sẽ giảm bớt được việc phải cài các cấu trúc DNA ở bất kỳ thời điểm nào. Chẳng hạn như, trong một dòng tế bào mà biểu hiện ổn định một vec tơ có chứa một dấu chuẩn chọn lọc thì chắc rằng bất kỳ tế bào nào trong quần thể này qua thâm nhiễm sẽ được cài vào những cấu trúc đóng gói vec tơ sao cho nó chỉ mã cho vùng vỏ và vùng *gag/pol*. Có một khoảng gối lên nhau rất rộng giữa bộ phận này với các các bộ phận nối tiếp trên các dòng tế bào đóng gói, nhưng có một nguyên lý chung là nếu có sự biểu hiện ổn định một cấu trúc mã cho protein gây độc cho tế bào đóng gói thì phải tránh xa và phải được thay thế mới nhờ sự thâm nhiễm tức thì vào hệ thống.



Hình 5.6 (a) các cấu trúc bộ trợ thường dùng bao gồm tất cả các protein retrovirus. (b) cấu trúc đặc biệt của một vec tơ cơ sở HIV, ở đó gen dị loại có thể được kiểm soát bởi promoter của nó, nếu trong antisense thì được kiểm soát bởi promoter của nó và tín hiệu polyadenylate hóa. (Theo Andrew M.L Lever, 1999)

5.3.5 Các dòng tế bào đóng gói

Đối với HIV, hiện nay một số tài liệu có đề cập tới các dòng tế bào biểu hiện ổn định các protein cấu trúc của virus. Nói chung, chúng được mô hình hóa trên hệ thống của chuột, trong đó gen của vỏ được biểu hiện biệt lập với cấu trúc *gag/pol*. Điều lý tưởng là giới hạn được độ pha loãng của tế bào chỉ biểu hiện một cấu trúc. Những tế bào biểu hiện cao cấu trúc đặc biệt đó sẽ được tách dòng và được biểu hiện kế tiếp và rồi lại giới hạn độ pha loãng được biểu hiện và như thế một quần thể dòng biểu hiện cao sẽ được lựa chọn. Chính sự khác biệt rất lớn về khả năng của các dòng với sự biểu hiện các protein virus đã biện minh cho vấn đề này. Chẳng hạn như sự khác biệt trong biểu hiện p24 lên tới 10^3 ở các dòng khi biểu hiện *gag* của HIV.

Nhiều nhóm nghiên cứu đã tạo được các dòng tế bào đóng gói trong đó cấu trúc *gag/pol* đã gây nhiễm được các tế bào với sự trợ giúp của một dấu chuẩn chọn lọc ổn định. Sự biểu hiện của *gag* phụ thuộc Rev (Rev-dependent) vì thế tế bào biểu hiện *gag/pol* cũng phải có RRE. Đây là một điểm yếu tiềm ẩn, trong đó chất biểu hiện (tế bào) protein vỏ cũng cần phải có RRE. Nhiều nhóm nghiên cứu chọn lọc các trình tự giống nhau trong các vec tơ của chúng để làm thích hợp nhất cho sự biểu hiện của cả 3 cấu trúc khi sản xuất các vec tơ thâm nhiễm có chứa RRE, điều này sẽ làm tăng độ mạo hiểm của tái tổ hợp. Những đột biến điểm được nhóm Pavlakis thực hiện ở gen *gag* như thế thì các trình tự của acid nucleic đã biến đổi nhưng trình tự mã amino acid thì lại không biến đổi. Rõ ràng là sự chuyển dịch INS tác động ở dạng *cis* là rất hiệu lực và nó đòi hỏi *gag* phải được tạo ra với phương thức độc lập với Rev (Rev-independent manner). Đó có thể là một khả năng nhằm tránh việc gộp thêm vào cả RRE. Một chiến lược khác là gộp thêm cả trình tự tác động *cis* khác thay thế được RRE. Ở virus khỉ Mason Pfizer (Mason Pfizer monkey virus), một trình tự tác động dạng *cis* – yếu tố vận chuyển cấu trúc (constitutive transporter element – CTE) đã được chứng minh là có khả năng tác động một cách độc lập với Rev, nó cho phép RNA ra khỏi nhân. Vì thế tế bào biểu hiện *gag/pol* có thể bao gồm CTE hơn là RRE. Yếu tố biểu hiện vỏ đã được xác định là có chứa RRE, nó như là một bộ phận của trình tự *env*. Những công trình gần đây chứng minh rằng với các vec tơ thì RRE sẽ làm cho hiệu ứng vận chuyển tăng cao hơn là CTE.

Tính phức tạp về mặt di truyền của HIV -1 là ở chỗ chẳng những gen *env* và *gag/pol* mà cả những gen điều hòa *tat* và *rev* cũng cần được biểu hiện. Các gen phụ như *vpr*, *vpu*, *vif* và *nef* có thể được bỏ qua khi chuyển gen vec tơ vào trong tế bào T khi các tế bào Cos-1 đã được dùng để sản xuất virus, nhưng trong các trường hợp khác thì vẫn đòi hỏi. Chẳng hạn như *vif* – là một đòi hỏi tuyệt đối đối với tính gây nhiễm của hạt virus, khi các tế bào sản xuất virus thiếu hụt *vif* thì sự thâm nhiễm sẽ bị hạn chế. Protein *vpu* kích thích đáng kể sự giải phóng các hạt virus khỏi tế bào và *vpr* cần thiết cho sự hợp nhất bên trong tế bào ở Go. Hệ gen HIV có thể được cắt nhỏ thành các đoạn mã cho 5'*gag/pol*, *vif* và 3'*tat*, *rev*, *vpu* và *env*.

Tuy nhiên, việc làm cân bằng sự biểu hiện của tất cả các gen từ đoạn 3' của hệ gen lại là một vấn đề khi chúng nằm ngoài ngữ cảnh di truyền của provirus. Hơn nữa, nếu một trong số đó được chọn lọc cho tế bào biểu hiện *gag/pol* thì hệ thống này lại cần sự có mặt của Rev.

5.3.5.1 Các vấn đề về protein

Các protein lentivirus đặt ra nhiều vấn đề rất đặc biệt như rất khó được biểu hiện ổn định trong một số dòng tế bào xác định. Enzyme protease của virus cần cho các tiến trình của các tiền thân gag và pol, nhưng nó lại là độc tố đối với một số dòng tế bào. Sở dĩ như vậy là vì protease có thể cắt nhỏ một số protein bộ khung tế bào. Các dòng tế bào có biểu hiện protease chỉ tăng lên khi có những đột biến điểm ở gen protease – nhằm trả lại sự thiếu hụt enzyme này. Một nhóm nghiên cứu khác lại phát hiện rằng thường thì khi sử dụng các dòng tế bào từ người sự biểu hiện protease có thể kéo dài hơn.

Sản phẩm của gen env cũng là độc tố tiềm ẩn đặc biệt đối với các tế bào có CD4 dương tính. Cũng có trường hợp người ta lại mô tả cả những dòng tế bào có CD4 âm tính, một vài trường hợp còn có thể phát hiện thấy mRNA của CD4 cũng bị tác động. Điều đó có thể là do mức CD4 trên bề mặt tế bào thấp hơn giới hạn phát hiện bằng kỹ thuật nhuộm tổ chức truyền thống. Tuy nhiên, bất kỳ một biểu hiện nào của CD4 trong một quần thể tế bào mà kèm theo cả sự biểu hiện gp120 thì có thể dẫn đến sự liên hợp và chết của tế bào. Đáng chú ý là một số dòng tế bào sản xuất các hạt HIV tốt nhất lại từ các tế bào lympho có CD4 trên bề mặt. Vì thế lại một lần nữa khẳng định, về nguyên tắc thì tốt nhất vẫn là dùng một dòng tế bào đóng gói mà không có CD4 trên bề mặt vì như thế nó sẽ làm giảm tối đa cơ hội tái nhiễm của dòng tế bào này bởi các vec tơ.

Cũng có những vấn đề cần xem xét về vai trò quan trọng của protein vpr đối với các tế bào ở Go. Vpr của nhiều dòng tế bào có thể gây cảm ứng làm ngừng chu kỳ tế bào. Người ta đã chứng minh rằng, vpr cần được tạo ra ở những dòng tế bào mà từ đó virion được sản sinh để tạo điều kiện cho việc tạo capsid. Có nhiều thí nghiệm đã chứng minh rõ rằng dòng tế bào được cung cấp vpr dạng *trans* thì bất hoạt. Trong các vec tơ hệ 3 plasmid *gag/pol*, *env*, thì cách thực tiễn nhất là có 2 trong số các cấu trúc này biểu hiện ổn định còn cấu trúc thứ 3 sẽ được đưa vào bằng gây nhiễm tức thì với khung đọc mở *vpr* trong cấu trúc này. Vpr có tính đặc hiệu mẫu (species), chẳng hạn như vpr của HIV-1 có hiệu ứng cao nhất đối với các dòng tế bào người và vpr của SIV tốt nhất với các dòng tế bào của khỉ. Cả 2 protein này đều kém hiệu quả đối với các tế bào dị loại. Điều này vạch rõ phạm vi sử dụng các vec tơ dị loại để tránh việc làm ngừng trệ sự phát triển. Thật hiếm thấy các dòng tế bào đóng gói lentivirus lại biểu hiện một cách ổn định các protein. Cơ chế của vấn đề này vẫn chưa được rõ.

5.3.5.2 Các cấu trúc có thể cảm ứng được

Để vượt qua các vấn đề này thì một dòng tế bào đóng gói phải có các thành phần có thể cảm ứng được. Vấn đề này đã thu được kết quả khi sử dụng hệ thống biểu hiện tetracycline (tet) mạnh để kiểm soát các sản phẩm Rev và Env. Hệ thống này cho phép biểu hiện cao nhưng ngăn hạn các protein mong muốn. Động học của việc sản xuất các protein cấu trúc trong hệ thống này thường là chậm (với hệ thống có cơ sở là tet, trong một số trường hợp cảm ứng tối đa là trên 5 ngày). Mặc dù hệ thống này thuận tiện cho các thí nghiệm trong phòng thí nghiệm, nhưng nó vẫn còn rất phức tạp và khó tiêu chuẩn hóa để có thể sản xuất đại trà.

5.3.6 Sự giả vỏ (envelope pseudotyping)

Nhiều nghiên cứu đề cập vấn đề lớp vỏ giả dị loại của lõi virus. Lõi HIV được chứng minh là có sự sao giả vec tơ chuột mặc dầu với độ chuẩn thấp hơn nhiều so với độ chuẩn lớp vỏ lưỡng tính nguyên bản của chuột. Gần đây hơn, người ta đã sử dụng lớp vỏ không phải của retrovirus đặc biệt là lớp vỏ (protein G) của virus gây bệnh nước ở miệng (vesicular stomatitis virus – VSV). Những lớp vỏ này là do sự sao giả của các lõi HIV, nó tạo ra được các hạt virus ổn định khi đông khô và cho độ chuẩn CD34 cao ở quần thể tế bào gốc của tủy xương. Sự tổ hợp của lõi lentivirus và vỏ VSV rõ ràng là làm cho sự chuyển gen tới các tế bào Go có hiệu lực. Khi thí nghiệm song song với các vec tơ chuột thì thấy độ chuẩn của chúng rơi xuống gần số không. Ấn tượng hơn là tiêm trực tiếp vào não động vật các hạt virus HIV có VSV-G giả thì có khả năng ổn định tốt sự chuyển gen vào trong các neuron và các tế bào thần kinh đệm. VSV giả cho phép các hạt vec tơ qua đường nhân để vào được bên trong nên làm tăng hiệu quả chuyển gen. Thời đại đương thời người ta quan tâm rất nhiều tới sự chuyển gen đến nhiều mô *in vitro*. Tuy nhiên, rõ ràng là nếu độ chuẩn *in vitro* lên tới 10^9 thì vẫn là tương đối thấp đối với sự tải nạp các tế bào *in vivo*. Vẫn còn những bàn cãi về hiệu lực của các vec tơ này đối với sự chuyển gen tới các đích quan trọng như các tế bào gốc tạo máu chẳng hạn.

5.3.7 Sự chuyển giao protein

HIV là một trong số các virus đầu tiên được mở xẻ về sự tương tác protein – protein dẫn đến sự hợp nhất các protein phụ trong các hạt virus. Chẳng hạn như protein Vpr có trong các hạt virus dẫn tới sự tương tác đặc hiệu với phần P6 của Gag và trong sự tương tác này thì đột biến được xác định là có liên quan tới các amino acid. Tương tự như vậy, một protein của tế bào- cyclophilin tương tác trực tiếp với CA. Hiện tượng này đã được người ta tận dụng để đưa các vùng gắn với P6 vào trong các protein dị loại và cũng để chứng minh cho sự hợp nhất của các phân tử đầu tận trong các hạt virus. Mặc dầu gen trị liệu và hệ thống vec tơ với mục đích thông thường là chuyển các trình tự acid nucleic, nhưng rõ ràng là nó còn được ứng dụng nhiều trong việc chuyển giao các protein tới tế bào.

5.3.8 Độ chuẩn virus

Khi các RNA virus đủ độ dài hợp nhất trong các hạt virus, thậm chí với các gen dị loại hợp nhất thay thế *nef* hoặc thay thế một phần trình tự của vỏ thì hiệu quả của sự đóng capsid và chuyển giao dường như là cực kỳ cao. Những vec tơ có độ dài ngắn hơn hệ gen thì không có kết quả. Thậm chí sự hợp nhất của tất cả các trình tự tín hiệu đóng gói trong một vec tơ gồm cả vòng gốc TAR, trình tự dẫn 5' (5' leader sequence), gen *gag*, đầu cuối 3' của vỏ hay RRE đơn lẻ hiếm khi đạt được độ chuẩn lớn hơn 10^3 cfu/ml. Lý do tại sao thì vẫn chưa rõ và rõ ràng là các vec tơ lentivirus của chuột đối với sự đóng capsid (capsid hóa) đạt mức tương đương với RNA virus hoang dại. Điều này làm cho ta chú ý nhiều tới lentivirus đối với sự capsid RNA mã cho protein Gag.

5.4 Phạm vi ứng dụng

Việc sử dụng các vec tơ có cơ sở lentivirus đã được nhắc tới ngay từ đầu chương. Vai trò hiển nhiên của nó là chuyển các gen tới các tế bào dương tính với CD4 để thực hiện

gen trị liệu đối với các thâm nhiễm HIV. Vấn đề này trước tiên là hướng tới các bệnh nhân đã có HIV dương tính, nhằm bảo vệ về mặt di truyền cho các tế bào CD4 trong cơ thể chưa bị nhiễm virus. Các bệnh khác có ảnh hưởng tới bạch cầu và các tế bào đơn nhân, đại thực bào cũng là những mục tiêu hướng tới.

Việc sử dụng các lentivirus hay chimera lentivirus cho các tế bào không ở giai đoạn đang phân chia tuy đã được chứng minh nhưng vẫn còn phải kéo dài thêm một thời gian nữa. Hầu hết những người có liên quan tới việc nghiên cứu vec tơ đều có khái niệm cho rằng một vec tơ hoàn thiện sẽ phải là sự hòa trộn của các thành phần từ các virus khác nhau, mỗi thành phần có một đặc tính riêng và cuối cùng những thành phần này có thể sẽ được hợp nhất thành một hạt không phải là virus hoàn chỉnh.

5.5 Độ an toàn

Ở Anh Quốc HIV và SIV được xếp vào hạng thứ 3 trong các tác nhân gây bệnh và tất cả các công việc có liên quan tới virus sống hoặc các cấu trúc phụ nhưng có thể nảy sinh virus sống đều phải được cách ly bảo vệ. Những công việc liên quan tới các lentivirus khác (MVV, EIAV) thì phải lưu ý tới sự tiềm ẩn của các yếu tố gây bệnh cho động vật.

Cho đến bây giờ vẫn chưa có một quy trình thử nghiệm lâm sàng nào được phê chuẩn với việc sử dụng lentivirus toàn phần hay từng phần trong việc chuyển gen trên người. Dường như có sự khác nhau đôi chút về mức độ đòi hỏi về độ an toàn đối với một vec tơ bao hàm tất cả các thành phần của retrovirus chuột với một vec tơ là chimera trong đó một bộ phận của chimera có liên quan tới lentivirus.

Chương VI

CÁC VEC TƠ ADENOVIRUS

6.1 Mở đầu

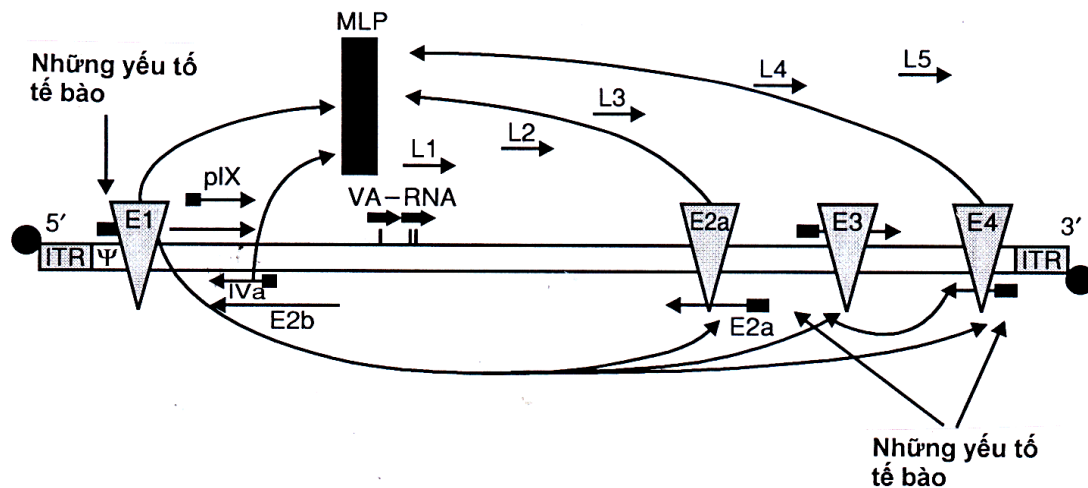
Các vec tơ adenovirus là một trong số các phương tiện chuyển gen trực tiếp hứa hẹn nhất *in vivo* trong gen trị liệu trên người điều trị các bệnh di truyền đơn gen như bệnh xơ nang, bệnh đau cơ Duchenne và bệnh ưa chảy máu A và B cũng như các bệnh mắc phải như ung thư (Trapnell và Gorziglia, 1994; Wilson, 1995). Hơn nữa, việc sử dụng các vec tơ adenovirus trong các trị liệu *ex vivo* cũng đã được đánh giá. Các vec tơ adenovirus có nhiều lợi thế vượt hẳn các hệ thống chuyển gen khác, nó có thể tải nạp được nhiều dạng tế bào và không đòi hỏi tế bào đích phải phân chia trong chuyển và biểu hiện gen. Nhiễm sắc thể của adenovirus còn duy trì được episome trong tế bào tải nạp, vì vậy tránh được khả năng đột biến ghép (Gingsberg, 1984; Horowitz, 1990). Adenovirus có thể hoàn trả những thiếu hụt về sao chép do các gen điều hòa đặc biệt của virus đã bị loại đi (Berkner, 1988; Gorziglia và cộng tác., 1996), điều đó cho phép các vec tơ điều tiết được việc cài DNA dị gen trên 8 kb - tùy thuộc vào độ dài đoạn gen đã bị loại trừ. Sau nữa, người ta vẫn chưa thấy sự thâm nhiễm adenovirus nào có liên quan tới việc tạo khối u trên người, vì thế adenovirus được coi như là một vaccine sống có trong hàng triệu con người (Straus, 1984). Bất lợi chính của các vec tơ adenovirus là gây đáp ứng miễn dịch đối với vật chủ vì thế mà làm giới hạn thời gian biểu hiện của gen chuyển và khả năng tái sử dụng vec tơ. Những cố gắng hiện nay hướng trực tiếp vào việc làm giảm tính sinh miễn dịch của các vec tơ và phát triển các chiến lược đánh lừa đáp ứng miễn dịch của vật chủ. Vài năm trước đây cũng có một số công trình thông báo đã chuyển giao thành công qua trung gian vec tơ adenovirus cũng như biểu hiện được nhiều gen dị loại ở một số động vật (Trapnell và Gorziglia, 1994; Wilson, 1995). Cho tới nay, các vec tơ adenovirus đã được sử dụng hoặc dự định sử dụng trong trị liệu lâm sàng trên người các bệnh xơ nang, bệnh thiếu hụt ornithine transcarbamoylase và các dạng ung thư như: ung thư vú, kết tràng, nguyên bào xốp, ung thư đầu và cổ, u hắc tố da, u nguyên bào thần kinh, u buồng trứng, u tuyến tiền liệt (Marcel và Grauz, 1996) và u phổi (Cohen – Haguenaue, 1996). Tuy nhiên, gen trị liệu qua trung gian vec tơ adenovirus đều phải thực hiện ở giai đoạn sớm, tất cả các nghiên cứu đều ở pha I với mục đích đảm bảo an toàn hơn là tính đến hiệu quả.

6.2 Cấu trúc và tổ chức của adenovirus

Adenovirus trên người là các virus DNA không vỏ, thuộc họ parvoviridae (Ginsberg, 1984; Horowitz, 1990). Đường kính của virion là 80-90nm với hình thái icosohedral nhọn, khối lượng nguyên tử 175-185 x 10⁶ Da. Theo huyết thanh học, các adenovirus được phân

thành gần 50 serotype, với các dưới nhóm từ A tới G (Wadell, 1984). Các virus thuộc dưới nhóm A và B tiềm ẩn khả năng gây ung thư trên các loài gặm nhấm mới sinh, các virus dùng trong chuyển gen thuộc dưới nhóm C, không gây khối u. Adenovirus dưới nhóm C chỉ gây các bệnh hô hấp nhẹ trên người, chiếm khoảng 5-15% các trường hợp cúm thông thường (Straus, 1984).

Adenovirus đã phân lập được cách đây trên 40 năm (Rowe và cộng sự., 1953), những hiểu biết về hệ thống di truyền của adenovirus cũng tăng lên không ngừng, một phần cũng vì adenovirus sớm được để ý tới như một mô hình biểu hiện gen với các tế bào nhân chuẩn (Ginsberg, 1984; Horowitz, 1990). Adenovirus thâm nhiễm các tế bào đích bằng cách gắn vào receptor của coxsackie và adenovirus (coxsackie and adenovirus receptor – CAR) trên bề mặt tế bào (Bergelson và cộng sự., 1997) nó được “hòa nhập” qua các lỗ bọc clathrine để đi vào thể THNB (endosome), virion được loại khỏi tế bào chất bằng cơ chế ly giải nội bào (endosomolysis), sự chuyển vị tới màng nhân qua các tín hiệu đích trong các polypeptide capsid, hệ gen virus được chuyển vào nhân tế bào, ở đó nó duy trì ở dạng episome.



Hình 6.1. Sơ đồ đại diện của hệ gen adenovirus và sự điều hòa phiên mã. Hệ gen của adenovirus xếp thẳng hàng song song, các đơn vị phiên mã là các vùng có mũi tên. Các mũi tên trên chỉ hướng của phiên mã. Các mũi tên cong chỉ các con đường chuyển hoạt hóa. Các đơn vị phiên mã trung bình hoặc nhỏ là pIX, IVa và VA-RNA (I-III). Những vùng lặp tận cùng đảo ngược là các ITR cũng như các protein 55 kDa liên kết đồng hóa trị với đầu 5' của hệ gen. Cả vùng ITR và sự có mặt của protein tận cùng đều cần cho việc sao chép của virus có hiệu quả. Phần chính của vec tơ adenovirus thế hệ thứ nhất (Av1) có cả những phần loại bỏ E1 và E3; tuy nhiên, một vài vec tơ Av1 chỉ chứa vùng loại bỏ E1. Loại bỏ vùng E1 sẽ làm cho sự sao chép của virus bị suy giảm vì các sản phẩm của gen E1 điều chỉnh lên các đơn vị phiên mã chính của virus như E2, E3, E4 và promoter muộn chính (major late promoter-MLP) (được chỉ bằng mũi tên cong). E1, E2 và E4 được hoạt hóa bởi yếu tố phiên mã trong tế bào vật chủ. Các vec tơ thế hệ 3 (Av3) kiểm chế ngoài những phần cắt bỏ E1 và E3 còn thêm cả vùng E2a đã loại bớt một phần. Các vec tơ loại kết hợp E1/E3/E4 cũng đã được thiết lập. Những vec tơ được loại bớt sau này làm giảm được sự biểu hiện của các đơn vị phiên mã muộn do ngăn ngừa được việc điều chỉnh lên của MLP bởi các sản phẩm của gen E2a hoặc E4.

Ghi chú: (I)- protein tận; (II)- promoter.

(Theo Sheila Connelly. Gene Therapy Technologies, Applications and regulations. John Wiley & Sons Ltd 1999).

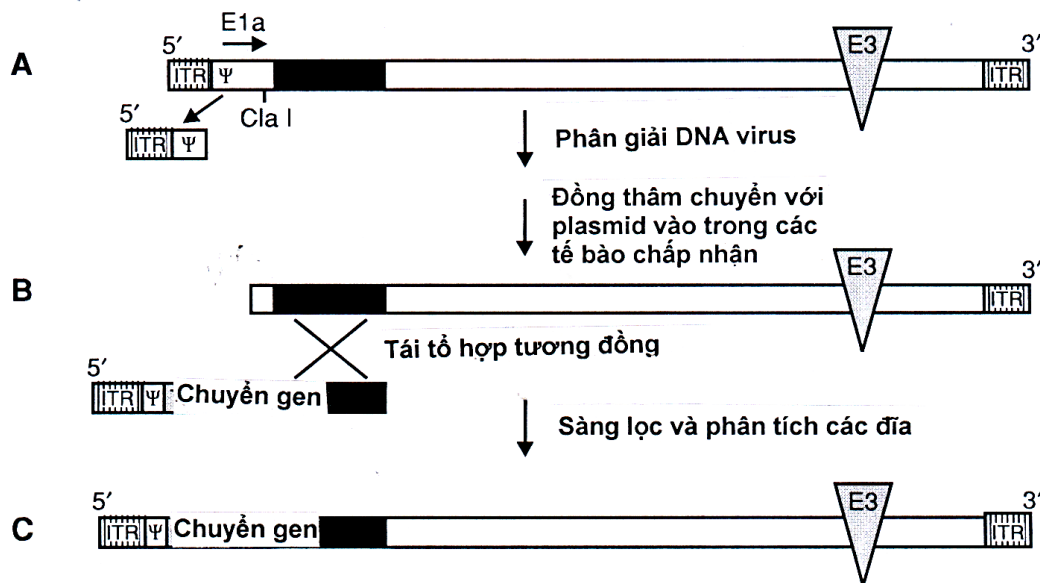
Hệ gen adenovirus gồm các phân tử DNA chuỗi kép, thẳng với chiều dài 36 kb, có các liên kết đồng hóa trị gắn đầu 5' với một protein tận cùng 55 kDa cần cho sự sao chép của DNA virus. DNA virus có chứa những đoạn lặp tận cùng đảo ngược, ngắn (short, inverted repeats –ITR) ở mỗi đầu cuối của hệ gen – cần cho sự sao chép DNA. Hệ gen virus được tổ chức với 4 vùng phân biệt sớm có tên từ E1 đến E4 và 5 vùng ghép muộn từ L1 đến L5 – cơ sở cho sự biểu hiện trước hay sau sự khởi đầu tổng hợp DNA virus, thêm vào đó còn có một vài trung gian phụ hoặc các đơn vị phiên mã muộn (Hình 6.1). Nói chung các sản phẩm sớm của gen đã làm thay đổi sinh học tế bào vật chủ để giúp cho việc sản xuất virus, còn những gen muộn lại mã cho hầu hết các protein cấu trúc là thành phần của virion và giúp cho sự lắp ráp của virus. Ngay khi hệ gen virus vào tới nhân, vùng E1 được phiên mã tích cực bởi các yếu tố phiên mã và mã hóa cho các protein có liên quan trực tiếp tới việc hoạt hóa các vùng E2, E3 và E4. Trong các tế bào nuôi cấy, các sản phẩm gen E1 được mã trong vùng E1a và E1b đã sao chép thông tin virus cảm ứng (Van der Eb và cộng sự., 1997). Vùng E2 mã cho các protein cần cho sự sao chép DNA virus bao gồm một protein gắn DNA chuỗi đơn (E2a) và polymerase DNA virus cũng như protein tận cùng 55 kDa. Vùng E3 là tập hợp của các đơn vị phiên mã liên quan tới việc lẩn tránh các cơ chế bảo vệ của vật chủ, loại trừ các tế bào đã bị nhiễm virus, và không thiết yếu đối với sự sao chép của virus (Wold và Gooding, 1991). Các sản phẩm của gen E4 có liên quan tới việc điều hòa biểu hiện protein của tế bào và virus, sự sao chép DNA của virus, sự tích trữ mRNA của virus và sự tổng hợp protein, điều chỉnh xuống một cách tương ứng sự tổng hợp protein vật chủ. Một công trình mới đây chứng minh rằng protein E4 mã trong khung đọc mở 6, có tiềm năng gây ung thư tương tự như gen E1b (Moore và cộng sự., 1996). Sự biểu hiện của các gen sớm dẫn đến sao chép DNA khoảng 8 giờ sau khi thâm nhiễm và sự hoạt hóa tiếp của các gen muộn dưới sự kiểm soát phiên mã của promoter muộn sẽ sản sinh ra các virus con cháu và cuối cùng là các tế bào vật chủ chết và virus được giải phóng.

6.3 Thiết kế và cấu trúc vec tơ adenovirus người khiếm khuyết sao chép

Các vec tơ adenovirus khiếm khuyết sao chép cũng tương tự như những vec tơ virus khác, chúng gồm một cấu trúc virion bao quanh hệ gen virus đã cải biến. Cho tới nay, hầu hết các hạt vec tơ cơ sở cấu trúc capsid dạng hoang dã, ngoài nhiệm vụ bảo vệ DNA virus nó còn là phương tiện để gắn và đi vào bên trong tế bào đích (tải nạp). Tuy nhiên, hệ gen virus đã có những cải biến đáng kể. Những biến đổi này được thiết lập nhằm vô hiệu hóa sự phát triển của virus trong tế bào đích do đã loại trừ những chức năng đặc biệt của virus đối với sự điều hòa sao chép DNA và sự biểu hiện gen virus trong khi vẫn có thể phát triển trong tế bào đóng gói hoặc tế bào trợ giúp. Việc loại bỏ các trình tự như vậy tạo ra không gian trong hệ gen virus để DNA ngoại sinh vẫn cài vào được mà vẫn biểu hiện được các gen chuyển.

Các adenovirus dưới nhóm C, serotype 2 và 5 (Ad2 và Ad5) là những adenovirus được nghiên cứu nhiều nhất và những virus này thường dùng như các vec tơ chuyển gen. Các vec tơ adenovirus được dùng cho gen trị liệu chủ yếu là các vec tơ thay thế E1, ở đó các gen chuyển được cài vào vùng E1. Vùng bị loại trừ của E1 bao gồm toàn bộ hệ gen E1a và khoảng 60% gen E1b. Ngoài phần còn lại của hệ gen virus, vec tơ này còn giữ lại đầu

5' gần nhất của hệ gen virus bao gồm các đoạn lặp tận cùng đảo ngược bên trái (left inverted terminal – ITR) và tín hiệu đóng capsid (Ψ), các trình tự cần cho sự đóng gói và những vùng tăng cường (enhancer) E1 nối nhau (Hình 6.1). Vì các sản phẩm gen E1 sẽ làm hoạt hóa liên tục các đơn vị phiên mã chính nên khi loại trừ các vùng này thì sự biểu hiện sớm và muộn của gen sẽ giảm đi rất nhiều và làm sự sao chép của virus suy yếu một cách nghiêm trọng (Berkner, 1988). Để có không gian lớn hơn trong các vec tơ adenovirus cài các gen chuyển thì vùng E3 cũng thường được loại trừ vì không đòi hỏi sự sao chép hoặc phát triển ở vùng này. Đôi khi gen chuyển lại được cài vào vùng bị loại của E3. Các vec tơ adenovirus chỉ thiếu vùng E1 và E3 chính là các vec tơ thể hệ thứ nhất Av1. Các vec tơ adenovirus có thể đóng gói DNA hiệu quả với 105% kích thước của hệ gen (Bett và cộng sự., 1993), tương đương với 8 kb DNA ngoại sinh trong vec tơ Av1 đã loại trừ E1/E3.



Hình 6.2 Tạo các adenovirus tái tổ hợp. (A) DNA hệ gen adenovirus được chuẩn bị bằng *Cla*I của Ad5 – dl327 đột biến loại bỏ vùng E3 cắt bỏ đuôi bên trái hệ gen virus làm cho không bị nhiễm DNA virus. (B) plasmid A chứa ITR virus và tín hiệu đóng gói, đơn vị phiên mã gen chuyển và một kilobase hoặc hơn DNA adenovirus được cộng thâm chuyển với DNA đã được chuẩn bị để đưa vào các tế bào được phép. (C) nhờ kết quả của tái tổ hợp dị loại nội bào, một vec tơ adenovirus tái tổ hợp đã loại bỏ E1/E3 có chứa những gen E1 thay thế cho các gen chuyển đã được tạo ra. Mũi tên ngang đại diện cho đơn vị phiên mã E1.

Ghi chú:($\square$)-đơn vị phiên mã gen chuyển ngoại sinh;(□)vùng tái tổ hợp tương đồng;(□)DNA hệ gen adenovirus. Tam giác lớn đại diện cho phần loại trừ của vùng E3 adenovirus.

(Theo Sheila Connolly. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

Các vec tơ Av1 được cấu trúc theo nhiều cách, kỹ thuật thông thường nhất được sử dụng là thông qua tái tổ hợp dị gen hệ gen virus với plasmid có mang gen chuyển (Berkner. 1988). Nói ngắn gọn là các đơn vị phiên mã của gen chuyển được cài vào một

plasmid có chứa một đoạn của hệ gen. Plasmid này được cộng thâm chuyển (nhiễm) vào một dòng tế bào được phép (xem dưới đây), các DNA virus được chuẩn bị theo các kỹ thuật chuyển DNA truyền thống. Trong tế bào, do tái tổ hợp dị loại mà cứu vẫn được các trình tự virus đã tách dòng và gen chuyển vào được hệ gen virus, vì thế mà tạo được các vec tơ *tái tổ hợp* (Hình 6.2). Để tạo các vec tơ Av1 với gen chuyển cài vào vùng E1, plasmid phải chứa đuôi bên trái của hệ gen virus bao gồm ITR và tín hiệu đóng capsid, hộp biểu hiện gen chuyển và trình tự DNA virus phía cuối của virus với độ dài xấp xỉ hoặc hơn 1 kb (Berkner và Sharp, 1983). DNA virus dùng trong cộng thâm chuyển (nhiễm) được chuẩn bị bằng enzyme cắt giới hạn loại trừ đuôi phía trái hệ gen virus. Các chế phẩm DNA virus được chuẩn bị theo cách này sẽ làm giảm khả năng thâm nhiễm của DNA bố mẹ và vì thế làm tăng hiệu lực của các vec tơ tái tổ hợp cô lập được tạo ra từ tái tổ hợp *in vitro*. Đoạn DNA khá lớn (~ 43 kb) phân lập từ các mẫu đột biến loại bỏ E3 của Ad5, dl327 (Thimmappay và cộng sự., 1982) được phân cắt với enzyme giới hạn Cla I và làm tinh khiết bằng lọc gel cũng là những thường quy (Smith và cộng sự., 1993). Một cách tương tự, DNA dị loại có thể được cài vào vùng E3. Tuy nhiên, trong trường hợp này, plasmid phải chứa phần cuối phía phải hệ gen adenovirus và DNA virus được chuẩn bị bằng enzyme tiêu hóa giới hạn để loại trừ phần cuối bên phải hệ gen virus. Cuối cùng, người ta đã sử dụng quy trình cộng thâm nhiễm bằng cách dùng enzyme giới hạn cắt DNA virus để giữ lại một protein tận cùng 55 kDa liên kết đồng hóa trị với đầu 5' của hệ gen virus (Sharp và cộng sự., 1976). Khi đó tính thâm nhiễm của DNA virus có chứa protein tận cùng cao gấp 10 lần DNA hệ gen bị phân cắt bằng protease (Sharp và cộng sự., 1976), như vậy chắc chắn là virus không tái tổ hợp có một lượng nhỏ DNA không bị phân cắt đã làm cho tính thâm nhiễm tăng cao (Berkner và sharp, 1983). Tiếp theo sự thâm chuyển, tiếp tục phân tích sàng lọc, thăm Southern và biểu hiện gen chuyển sẽ xác định được vec tơ tái tổ hợp mong muốn (Graham và Prevec, 1991).

Phương pháp khác dùng để tạo vec tơ adenovirus là tách dòng trực tiếp các trình tự plasmid rồi đưa vào hệ gen adenovirus qua những vị trí thích hợp và thâm chuyển tiếp các tế bào được phép bằng việc liên kết *in vitro* với DNA. Đó là phương pháp gốc để tạo các đột biến adenovirus (Stow, 1981).

Một vấn đề quan trọng liên quan tới việc sản xuất các vec tơ adenovirus là gắn trực tiếp hoặc tái tổ hợp dị loại giữa plasmid và DNA virus sẽ cứu sống được virus bố mẹ do vẫn còn lưu giữ được DNA virus bố mẹ thâm nhiễm. Tuy nhiên, sự phục hồi của virus tái tổ hợp này với nền tảng như vậy là rất khó, đặc biệt nếu các vec tơ công nghệ hóa lại phát triển khá chậm so với virus bố mẹ. Có một vài cách tiếp cận khá thông minh giải quyết được vấn đề này. Chẳng hạn như, các vec tơ bố mẹ sao chép kém được sử dụng để loại trừ khả năng vượt quá mức tái tổ hợp mong muốn (Berner, 1988). Tương tự như vậy, vec tơ Av1 biểu hiện được một kiểu hình (phenotype) rất quan trọng là do cài gen thymidine kinase (TK) của virus herpes simplex vào hệ gen virus (Imler và cộng sự., 1995). Sự biểu hiện của các sản phẩm gen TK để phòng được sự sao chép virus khi có mặt một nucleoside giống như ganciclovir, điều đó cho phép chỉ lựa chọn các vec tơ tái tổ hợp trong đó gen TK đã được thay thế (Imler và cộng sự., 1995).

Một phương pháp khác lại không cần DNA virus thâm nhiễm bằng cách dùng plasmid có chứa toàn bộ hệ gen adenovirus (Ghosh- Choudhury và cộng sự., 1986; Bett và cộng sự., 1994). Virus thâm nhiễm có thể được tạo ra bằng sự thâm chuyển một hoặc nhiều plasmid có chứa DNA adenovirus. Tuy nhiên, hiệu lực thâm chuyển của DNA plasmid thấp hơn nhiều so với DNA virus (Ghosh- Choudhury và cộng sự., 1986; Bett và cộng sự.,

1994). Cũng tương tự như vậy, hệ gen đầy đủ của Ad2 được cấu trúc như nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (yeast artificial chromosome –YAC) lại có tính thâm nhiễm (Ketner và cộng sự., 1994). Nhờ các kỹ thuật di truyền truyền thống về nấm men, các trình tự virus chứa YAC có thể được cải biến và các vec tơ adenovirus có thể tìm lại được từ các dòng YAC (Ketner và cộng sự., 1994).

Đơn vị phiên mã gen chuyển bao gồm các yếu tố cần cho sự biểu hiện thích hợp gen chuyển chẳng hạn như các promoter, các gen cần quan tâm và tín hiệu polyadenylate hóa, trong đa số trường hợp nó được thiết kế để đạt mức tối đa về sự biểu hiện gen ngoại sinh. Đối với sự biểu hiện của gen chuyển thì phải có những thay đổi lớn về promoter, điều này tùy thuộc vào mục đích ứng dụng và mô đích mà lựa chọn cho phù hợp. Rõ ràng là sự biểu hiện cấu trúc promoter virus như promoter adenovirus chính muộn hơn (Stratford – Perricaudet và cộng sự., 1990), promoter virus Rous sarcoma (Stratford – Perricaudet và cộng sự., 1992; Smith và cộng sự., 1993), promoter cytomegalovirus (CMV) (Herz và Gerard, 1993) và promoter β – actin kích thích CMV lại (Kozarsky và cộng sự., 1993) ... đều được hợp nhất trong các vec tơ adenovirus tái tổ hợp. Gần đây hơn, người ta dùng tế bào, các promoter đặc hiệu mô như promoter albumin đặc hiệu gan (Connelly và cộng sự., 1995, 1996), promoter điều hòa độ dẫn điện màng gây xơ nang đặc hiệu phổi (Imler và cộng sự., 1996; Suzuki và cộng sự., 1996), promoter chuỗi nhẹ đặc hiệu myosin cơ tim (Rothmann và cộng sự., 1996) và promoter β –fetoprotein đặc hiệu gan (Kaneko và cộng sự., 1995; Arbutnot và cộng sự., 1996)... cũng đã được mô tả. Cuối cùng là các promoter điều hòa đáp ứng hormone (Haysahi và cộng sự., 1994) hoặc các tác nhân được lý (Suzuki và cộng sự., 1996) cũng được hợp nhất vào trong các vec tơ adenovirus. Việc gộp vec tơ đặc hiệu mô với vec tơ điều hòa đối với hợp biểu hiện gen chuyển tránh được những hậu quả tiềm ẩn về sự biểu hiện quá mức trong các mô khác hơn là biểu hiện ở cơ quan đích và vì thế sẽ làm tăng độ an toàn của các vec tơ đó.

Một cách tiếp cận khác là tăng lượng gen chuyển trong các vec tơ adenovirus tức là đưa các yếu tố hệ gen vào trong hợp biểu hiện. Chẳng hạn như thêm một intron vào cDNA yếu tố VIII (FVIII) của người đã làm thúc đẩy sự biểu hiện *in vivo* lên khoảng 10 lần (Connelly và cộng sự., 1996) và việc gộp yếu tố IX (FIX) của người đã loại trừ intron đầu tiên và vùng 5' và 3' không được phiên dịch của cDNA yếu tố IX của người đã làm tăng 2000 lần yếu tố IX trong huyết tương chuột tải nạp (M. Kaleko). Cuối cùng, nhiều tín hiệu đã được sử dụng để polyadenylate hóa trực tiếp chẳng hạn như tín hiệu polyadenylate virus 40 của khi.

6.4 Sự nhân giống và làm tinh khiết các vec tơ adenovirus

Không giống như các vec tơ retrovirus, do tính ổn định của virion nên việc làm tinh khiết và cô đặc không làm ảnh hưởng tới hoạt tính của chúng. Các quy trình làm tinh khiết vec tơ adenovirus có liên quan tới việc thu lượng và phá hủy các tế bào đã bị thâm nhiễm bằng cách luân phiên đông lạnh và làm tan (Smith, 1995), hoặc dùng siêu âm (Kanegae và cộng sự., 1994) và loại bỏ cặn bằng ly tâm. Vec tơ được làm tinh khiết và cô đặc bằng ly tâm 3 bước với CsCl, sau đó đem thẩm tích hoặc tiến hành sắc ký. Tuy nhiên, với sản xuất lớn thì hay dùng phương pháp sắc ký hơn là ly tâm với CsCl. Độ đậm (nồng độ) vec tơ được xác định bằng quang phổ, xác định số hạt và tính chất sinh học, tính thâm nhiễm bằng sự chuyển gen hoặc các thí nghiệm khác (Mittereder và cộng sự., 1996). Để sử dụng trong lâm sàng trên người, các chế phẩm phải được phép của FDA về tỷ số đơn vị

thâm nhiễm dưới 1/100 hạt vec tơ (Smith, 1995; Mittereder và cộng sự., 1996). Người ta cô đặc các chế phẩm vec tơ trên những phiến chứa 10^{11} đơn vị/ml, trong một số trường hợp còn cao hơn nhiều so với các vec tơ retrovirus hay adenovirus liên hợp. Các chế phẩm vec tơ được test kỹ càng về RCA bằng phân tích PCR đặc hiệu E1 (Tolstoshev và cộng sự., 1994) và các thí nghiệm trên phiến. Hiện nay FDA đòi hỏi với lâm sàng là các adenovirus chỉ có 1 hoặc vài RCA trong một vec tơ (Smith, 1995).

6.5 Chuyển gen *in vivo* qua trung gian adenovirus

Vài năm trước đây đã có đánh giá kỹ càng về hiệu lực và độ an toàn của Av1 *in vivo* trên động vật và người nhằm nâng cao sự hiểu biết về tính chất sinh học của các vec tơ adenovirus (Trapnell và Gorziglia, 1994; Wilson, 1995). Sự đa dạng trong biểu hiện qua trung gian vec tơ adenovirus của các gen chuyển đã được đề cập đến như các gen β -galactosidase và luciferase trong nhiều mô, phổ biến nhất là ở phổi và gan. Sự biểu hiện gen qua trung gian adenovirus phụ thuộc vào mẫu hình động vật, vào vec tơ và liều lượng sử dụng, nhưng nói chung biểu hiện khởi đầu là cao. Tuy nhiên, thời hạn kéo dài của sự biểu hiện thì thay đổi rất lớn. Nhìn chung, chuột chưa chín về miễn dịch hay có sự thỏa hiệp miễn dịch thì biểu hiện dài hơn so với chuột trưởng thành (sự biểu hiện gen giảm rất mạnh trong 2-3 tuần lễ, có lẽ là do hệ miễn dịch đã làm giới hạn sự kéo dài của vec tơ (Trapnell và Gorziglia, 1994; Wilson, 1995). Tuy nhiên, sau khi vec tơ Av1 được truyền qua tĩnh mạch tới các động vật trưởng thành đã biểu hiện dài hạn yếu tố đông máu FVIII máu người (Connelly và cộng sự., 1996) và FIX (M. Kaleko). Sự tải nạp của cơ với các vec tơ Av1 trong một số trường hợp cũng thấy biểu hiện được kéo dài (Stratford – Perricaudet và cộng sự., 1992; Ragot và cộng sự., 1993; Vincent và cộng sự., 1993; Tripathy và cộng sự., 1996).

Người ta quan tâm nhiều tới việc phát triển gen trị liệu đối với 2 bệnh phổi di truyền thường gặp nhất, đó là bệnh thiếu hụt Π_1 – antitrypsin (Π_1 - AT) và bệnh xơ nang. Các kết quả thu được cho thấy nhiều gen được chuyển giao qua trung gian adenovirus như Π_1 - AT và cDNA điều hòa độ dẫn điện vận chuyển màng đối với bệnh xơ nang ở phổi người. Những thí nghiệm ban đầu đã mô tả là khi sử dụng phổi chuột bông như là mẫu hình động vật thì thấy chuột bông rất nhạy cảm với thâm nhiễm adenovirus tương tự như người. Khi nhỏ giọt qua khí quản vec tơ Av1 mã hóa Π_1 - AT thấy rõ có biểu hiện Π_1 - AT (Rosenfeld và cộng sự., 1991). Cũng tương tự như vậy *in vi vo* người ta đưa yếu tố dẫn điện vận chuyển màng bệnh xơ nang - CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) vào chuột bằng khí dung cũng thấy có sự biểu hiện CFTR và RNA của CFTR trong 6 tuần lễ (Rosenfeld và cộng sự., 1992). Mặc dầu hiệu lực của sự chuyển gen tới phổi là cao nhưng thời gian biểu hiện lại ngắn và lại liên quan tới nhiễm khuẩn cấp nhu mô phổi của chuột bông (Yet và cộng sự., 1994). Những nghiên cứu trên động vật cao cấp không phải là người (Simon và cộng sự., 1993) cũng thấy có sự tương tự về đáp ứng miễn dịch đối với vật chủ, nhưng thời gian biểu hiện kéo dài hơn. Vec tơ Av1 mã hóa CFTR biểu mô mũi bệnh nhân xơ nang đã điều chỉnh ngắn hạn sự tiết chloride mà không thấy độc tính của vec tơ (Zabner và cộng sự., 1993). Trong một thí nghiệm tách biệt, các vec tơ Av1 CFTR đã được đưa vào mũi và phổi bệnh nhân xơ nang, phát hiện thấy RNA của CFTR ở mũi sau 2 ngày được xử lý, không có bệnh nhân nào bị sốt và làm tăng độ chuẩn kháng thể với adenovirus và mức interleukin- 6 (Crystal và cộng sự., 1994).

Cơ quan chính thứ 2 trong gen trị liệu *in vitro* là gan. Có rất nhiều gen bao gồm những gen mã cho các yếu tố đông máu, các enzyme chuyển hóa và các lipoprotein là những ứng cử viên của gen trị liệu trên gan. Đáng kể nhất là việc đưa các vec tơ adenovirus vào tĩnh mạch ngoại biên chuột (Smith và cộng sự., 1993), hoặc chó (Connelly và cộng sự., 1996) và các động vật cao cấp không phait người (T.A.G. Smith) đã thu được kết quả tải nạp các tế bào gan, điều đó đã chứng minh được tính khả thi của sự chuyển giao vec tơ adenovirus hệ thống nhằm điều trị các bệnh gan. Có nhiều tiến bộ đạt được trong những năm gần đây trong gen trị liệu qua trung gian vec tơ adenovirus với các bệnh ưa chảy máu A và B, các bệnh thiếu hụt các yếu tố đông máu FVIII và FIX. Đưa qua tĩnh mạch liều thấp vec tơ Av1 mã hóa các yếu tố đông máu FVIII và FIX của người vào chuột trưởng thành đã thu được kết quả là biểu hiện rõ mức trị liệu các yếu tố đông máu ít nhất 5 tháng (Connelly và cộng sự., 1996) và 1 năm (M.Kaleko). Tuy nhiên, khi sử dụng các vec tơ với liều lượng cao gây độc cho tế bào gan thì mức biểu hiện cao khởi đầu của yếu tố đông máu lại nhanh chóng giảm xuống, điều đó chứng tỏ rằng độc tố của các vec tơ phụ thuộc liều lượng đã làm hạn chế sự tồn tại của vec tơ (Smith và cộng sự., 1993; Connelly và cộng sự., 1995, 1996). Việc phân phối các vec tơ adenovirus FVIII tới chó thiếu hụt FVIII đã chỉnh lý được hoàn toàn kiểu hình ưa chảy máu và biểu hiện cao FVIII người (Connelly, 1996). Tuy nhiên, sự biểu hiện FVIII ở chó chỉ là ngắn hạn do có phát triển các kháng thể ức chế FVIII của người (Connelly và cộng sự., 1996). Việc điều trị bệnh ưa chảy máu B của chó với vec tơ Av1 mã cho FIX đã chỉnh lý nhanh chóng kiểu hình bệnh chảy máu. Tuy nhiên, trong trường hợp này không phát hiện thấy các kháng thể đặc hiệu FIX của chó (Kay và cộng sự., 1994). Trong các mô hình khác với các bệnh mà đích là gan thì các vec tơ Av1 mã cho các gen ornithine transcarbamylase (Stratford-Perricaudet, 1990; Morsy và cộng sự., 1993), gen phenylalanine hydroxylase (Fang và cộng sự., 1994), gen apolipoprotein E (Stevenson và cộng sự., 1995) và gen receptor lipoprotein tỷ trọng thấp của người (Ishibashi và cộng sự., 1993)... đã được dùng trong điều trị với công nghệ di truyền trên chuột knockout những gen này.

Trong tất cả các trường hợp đều đã chứng minh rõ ràng có sự chỉnh lý (sửa chữa) các kiểu hình khiếm khuyết sau khi được trị liệu với vec tơ adenovirus. Tuy nhiên, trong đa số trường hợp, hiệu ứng trị liệu chỉ là nhất thời. Cũng tương tự như vậy, việc điều trị bệnh lipid cao ở thỏ Watanabe với vec tơ Av1 mã hóa receptor LDL đã làm giảm đáng kể mức cholesterol trong vòng 3 tuần (Kozarsky và cộng sự., 1994).

Các vec tơ Av1 đã được đánh giá và chứng minh là tải nạp hiệu quả với rất nhiều mô và cơ quan ngoài phổi và gan, chẳng hạn như tim (Kass- Eisler và cộng sự., 1993) hay cơ tim và xương (Stratford – Perricaudet và cộng sự., 1992; Kass – Eisler và cộng sự., 1993; Ragot và cộng sự., 1993; Vincent và cộng sự., 1993) hay tủy xương (Mitani và cộng sự., 1993), não (Le Gal La Sall và cộng sự., 1993), hệ TKTƯ (Bajocchi và cộng sự., 1993; Davidson và cộng sự., 1993), các tế bào nội mô (Lee và cộng sự., 1993; Lemarchant và cộng sự., 1993), thận (Moullier và cộng sự., 1994), các tế bào võng mạc (Jomary và cộng sự., 1994) và các u đặc (Haddada và cộng sự., 1993; Brody và cộng sự., 1994; Wilson và cộng sự., 1994).

Gen trị liệu qua trung gian vec tơ adenovirus với các bệnh mắc phải như ung thư cũng theo 2 chiến lược, thứ nhất là cảm ứng độc tính tế bào đối với các tế bào đặc hiệu khối u và thứ hai là kích thích tồn tại tính miễn dịch kháng khối u được cảm ứng bằng cách xử lý các mô có khối u với vec tơ adenovirus mã cho p53 (Will và cộng sự., 1994; Zhang và cộng sự., 1995) hoặc bằng cách sử dụng một tổ hợp gồm gen herpes thymidine kinase

và ganciclovir đã điều trị thành công các khối u mới hình thành trong các mô hình trên chuột (Chen và cộng sự., 1995; Yet và cộng sự., 1996). Với phương pháp tiêm chủng vec tơ Av1 mã cho cDNA interleukin-2 thì cũng thấy có sự tăng cường tính miễn dịch kháng khối u ở chuột (Haddada và cộng sự., 1995; Cordier và cộng sự., 1995; Huang và cộng sự., 1996).

6.6 Đánh lừa đáp ứng miễn dịch của vật chủ đối với sự chuyển gen *in vivo*

Mặc dầu các vectơ thể hệ thứ nhất tải nạp và biểu hiện gen chuyển với hiệu lực cao, nhưng trong nhiều trường hợp thời gian biểu hiện lại rất ngắn. Làm mất sự biểu hiện cùng với độc tính trực tiếp của vec tơ (Connelly và cộng sự., 1996), sự nhiễm trùng và tác động của các tế bào miễn dịch (Yet và cộng sự., 1994; Yang và cộng sự., 1994, 1995) đều dẫn đến sự hủy hoại tế bào tải nạp. Đặc tính của các tế bào tải nạp với vec tơ Av1 là biểu hiện của hầu hết các gen adenovirus giảm nhiều, mức protein virus được biểu hiện thấp (Mettereder và cộng sự 1994; Yang và cộng sự., 1994), những quan sát này đã chứng minh rằng có đáp ứng của lympho T gây độc tế bào (cytotoxic T lymphocyte – CTL) trực tiếp kháng lại các tế bào biểu hiện các gen chủ chốt của virus, kết cục là loại đi các tế bào đã được công nghệ hóa (Yang và cộng sự., 1994, 1995, 1996). Bởi vậy, giảm bớt hơn nữa sự biểu hiện gen virus có thể làm giảm đáp ứng miễn dịch (ĐUMD) của vật chủ đối với các tế bào tải nạp và làm tăng thời gian biểu hiện gen chuyển. Thật vậy, việc phát triển vec tơ adenovirus thể hệ hai Av2 với một protein gắn DNA nhạy cảm với nhiệt 72 kDa mã hóa ở vùng E2a của bộ khung virus sẽ cho phép kéo dài sự biểu hiện ở gan chuột trưởng thành có ĐUMD tốt cũng như giảm đáp ứng CTL (Engelhardt và cộng sự., 1994; Yang và cộng sự., 1994; Ye và cộng sự., 1996). Tuy nhiên, các phân tích về vec tơ Av2 trong các chuỗi khác nhau của chuột và chó bị bệnh ưa chảy máu B đã chỉ rõ không có sự khác biệt về thời gian biểu hiện gen chuyển so với vec tơ Av1 (Fang và cộng sự., 1996). Gần đây, người ta đã thiết lập được các vec tơ thể hệ thứ ba - Av3 mất các đoạn E1, E2a và E3 đã nâng cao tiềm năng sao chép DNA của vec tơ và sự biểu hiện của virus *in vitro* muộn hơn các vec tơ Av1 và Av2 (Gorziglia và cộng sự., 1996). Hơn nữa, cũng đã có các vec tơ adenovirus loại trừ nhiều đoạn trong các vùng E1 và E2 (Armentano và cộng sự., 1995; Wang và cộng sự., 1995; Gao và cộng sự., 1996; Yeh và cộng sự., 1996). Các vec tơ adenovirus thể hệ kế tiếp sẽ có nhiều đoạn loại bỏ quan trọng. Không nghi ngờ gì nữa, trong tương lai sẽ phải phát triển các dòng tế bào bổ sung để cung cấp các sản phẩm gen mất dạng *trans*. Sau cùng là việc sử dụng các vec tơ adenovirus chỉ chứa các tín hiệu đóng gói adenovirus thiết yếu và hợp biểu hiện gen chuyển (Clemens và cộng sự., 1996; Haecker và cộng sự., 1996; Kochanect và cộng sự 1996; Lieber và cộng sự., 1996). Tuy nhiên, những vec tơ này được phát triển với sự có mặt của các virus trợ giúp.

Nhưng thật khó mà tạo được một dòng tế bào đóng gói với đầy đủ các chức năng hỗ trợ virus, vì nếu được như vậy thì các sản phẩm của vec tơ sẽ không chứa các tạp chất từ virus trợ giúp. Những vec tơ virus “nhút nhát” sẽ có tiềm năng giảm thiểu độc tính tế bào và các ĐUMD tế bào cũng như thích ứng được với các đoạn DNA ngoại sinh lớn (trên 35 kb).

Phương pháp khác để làm giảm bớt ĐUMD tế bào đối với các tế bào tải nạp adenovirus nhưng vẫn duy trì biểu hiện gen chuyển là sử dụng các tác nhân kiểm chế miễn dịch như cyclosporin A (Fang và cộng sự., 1995), FK506 (Lochmüller và cộng sự 1995, 1996; Vilquin và cộng sự., 1995) và cyclophosphamide (Joose và cộng sự., 1996). Tuy nhiên, kéo dài việc sử dụng các chất kiểm chế miễn dịch có thể sẽ làm tăng cảm ứng các tác dụng phụ nghiêm trọng. Nhờ việc thay đổi các thuốc kiểm chế miễn dịch, các kháng thể đơn dòng kháng trực tiếp các protein trong tế bào T hoạt hóa nên đã làm giảm ĐUMD qua trung gian tế bào (Kay và cộng sự., 1995; Guerette và cộng sự., 1996; Yang và cộng sự., 1996). Vì thế, việc sử dụng các vec tơ adenovirus cải tiến với việc làm mất nhiều đoạn các gen chủ chốt của virus kết hợp với chế độ kiểm chế miễn dịch đã thiết kế được các khối tế bào mà tính miễn dịch qua trung gian tế bào đã cho phép kéo dài hơn sự biểu hiện gen chuyển.

Một hạn chế khác liên quan tới miễn dịch qua trung gian vật chủ đối với việc sử dụng các vec tơ adenovirus là nếu các vec tơ được dùng lặp đi lặp lại thì sẽ không thu được kết quả vì có ĐUMD thể dịch đối với protein capsid của virus (Smith và cộng sự., 1993; Kay và cộng sự 1994; Kozasky và cộng sự 1994; Yei và cộng sự 1994). Nói chung, bản chất của sự biểu hiện gen chuyển qua trung gian vec tơ adenovirus đòi hỏi phải có nhiều vec tơ đặc hiệu đối với các bệnh mãn tính như bệnh xơ nang và bệnh ưa chảy máu – vì những bệnh này phải điều trị kéo dài. Các nghiên cứu của Smith và cộng sự (1996) đã chứng minh rằng ĐUMD đối với vec tơ adenovirus còn phụ thuộc vào liều lượng và có thể được điều chỉnh ngay từ thời điểm khởi đầu bởi sự kiểm chế miễn dịch tức thời với cyclophosphamide hoặc deoxyspergualin (DSG) thì sẽ cho phép sử dụng lặp lại có hiệu quả với các vec tơ này.

Mới đây, người ta đã thành công trong việc trị liệu miễn dịch tổ hợp liều lượng thấp ít nhất với 3 vec tơ adenovirus (T.A.G. Smith). Hơn nữa, lặp lại sự chuyển giao vec tơ cũng đã thu được kết quả thông qua chiến lược kiểm chế miễn dịch (Yang và cộng sự., 1995.1996) và bằng cảm ứng dung nạp vec tơ ở chuột sơ sinh (Walter và cộng sự., 1996). Cuối cùng là việc sử dụng các adenovirus từ các serotype khác nhau như adenovirus trung hòa kháng thể, đó là một serotype virus không có phản ứng chéo và ngăn ngừa được sự tải nạp với một adenovirus của một serotype thứ hai (Kass – Eisler, 1996; Mastrangeli và cộng sự., 1996). Tuy nhiên, chiến lược này còn liên quan tới việc chế tạo và đặc tính của các đa vec tơ mã hóa cho các gen mà ta quan tâm.

Chương VII

CÁC VECTO^R ADENOVIRUS LIÊN HỢP

7.1 Mở đầu

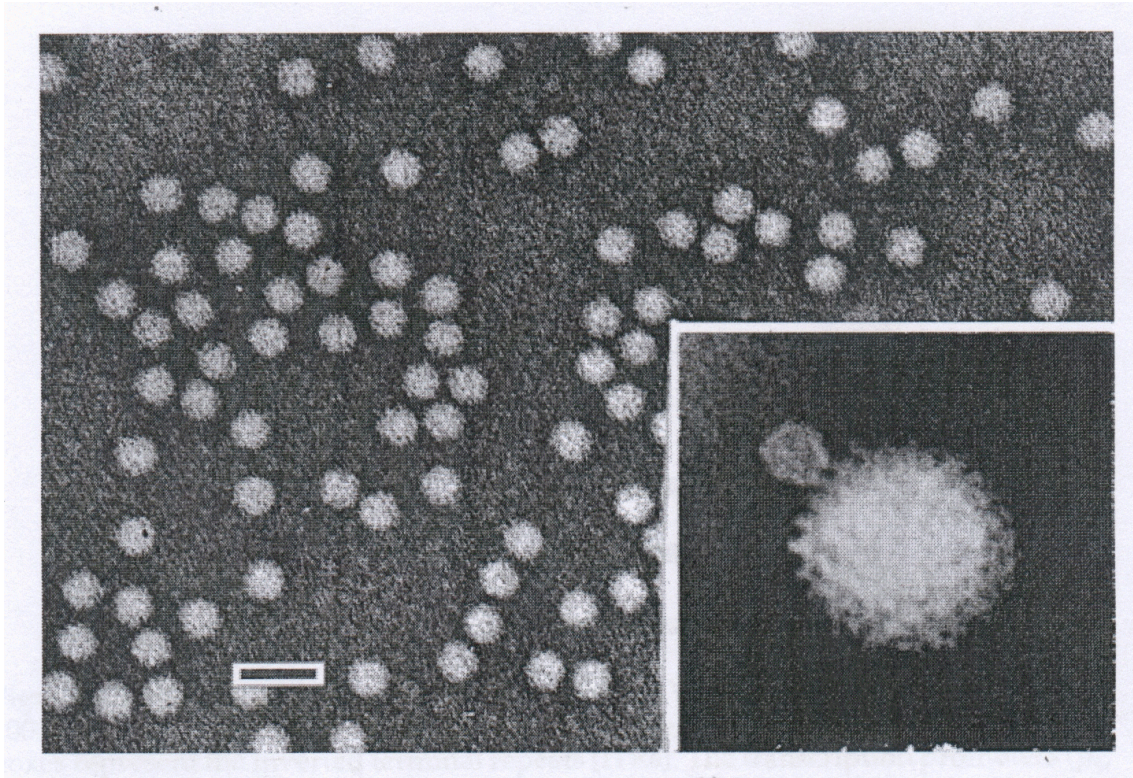
Virus adenovirus liên hợp (adeno – asociated virus – AAV) là virus DNA không gây bệnh cho người, với nét đặc trưng đặc biệt về các sinh học này nên nhiều năm nay nó đã nằm trong tầm ngắm của các nhà virus học phân tử (Berns, 1990; Carter, 1990; Flotte, 1993; Hermonat và Muzycka, 1984; Tratschin và cộng sự., 1984). Nhìn chung, AAV là virus duy nhất trong số các virus đang được sử dụng trong chuyển gen, đó là virus nguyên bản của người không gây bệnh và trên thực tế có thể ức chế cả khối u gây ra bởi các virus khác (Cukor và cộng sự., 1975; DeLaMaza và Carter, 1981; Hermonat, 1989, 1991; Khelif và cộng sự., 1991; Kirschstein và cộng sự., 1968; Labon và cộng sự., 1987; Mayor và cộng sự., 1973; Ostrove và cộng sự., 1981). Người ta sốt sắng một cách tự nhiên với việc ứng dụng một virus trong trị liệu là do tính cộng sinh tự nhiên với vật chủ của nó chính là con người. Tuy nhiên cũng phải hết sức thận trọng vì các tính chất sinh học của virus có thể thay đổi khi hệ gen của nó được công nghệ hóa để chuyển thành một vec tơ.

7.2 Tính chất sinh học của AAV

7.2.1 Phân loại và lịch sử tự nhiên của AAV

AAV trước đây được xác định như một tạp chất trong nuôi cấy adenovirus. Nhiều type huyết thanh của AAV cũng đã được xác định gồm serotype 1, 2 và 3 của người, serotype 4 AAV của khỉ cũng như các AAV của bò, chó và chim (Blacklow, 1988). AAV là thành viên của giống dependovirus thuộc họ Parvoviridae. Cũng giống như các parvovirus khác, AAV tồn tại như một hạt icosahedral không vỏ, đường kính khoảng 20nm (Hình 7.1).

AAV chứa bao giờ gây bệnh cho người mặc dầu có độ chuẩn huyết thanh cao. Các serotype 2 và 3 của AAV có trong họng và bệnh phẩm lấy từ hậu môn của trẻ em khỏe mạnh khi một trường học xảy ra bệnh tiêu chảy do bị cảm ứng adenovirus (Ad-) (Blacklow và cộng sự., 1971). Quan sát không thấy có sự khác biệt về các triệu chứng lâm sàng giữa người thâm nhiễm AAV cùng với Ad và những người chỉ thâm nhiễm Ad. Mặc dầu trong các tế bào người, AAV có thể ở trạng thái tiềm ẩn các quá trình tăng sản ung thư. Nhưng thật ngạc nhiên là, sự có mặt của các serotype AAV lại tỷ lệ nghịch với các rủi ro ung thư tử cung do cảm ứng virus (Cukor và cộng sự., 1975). Các nghiên cứu trên động vật và các mô hình nuôi cấy mô với các tác nhân gây khối u đã khẳng định rằng gen AAV *rep* có chức năng như một chất kiểm chế ung thư (Hermonat, 1991; Kleift và cộng sự., 1991; Labow và cộng sự., 1987).

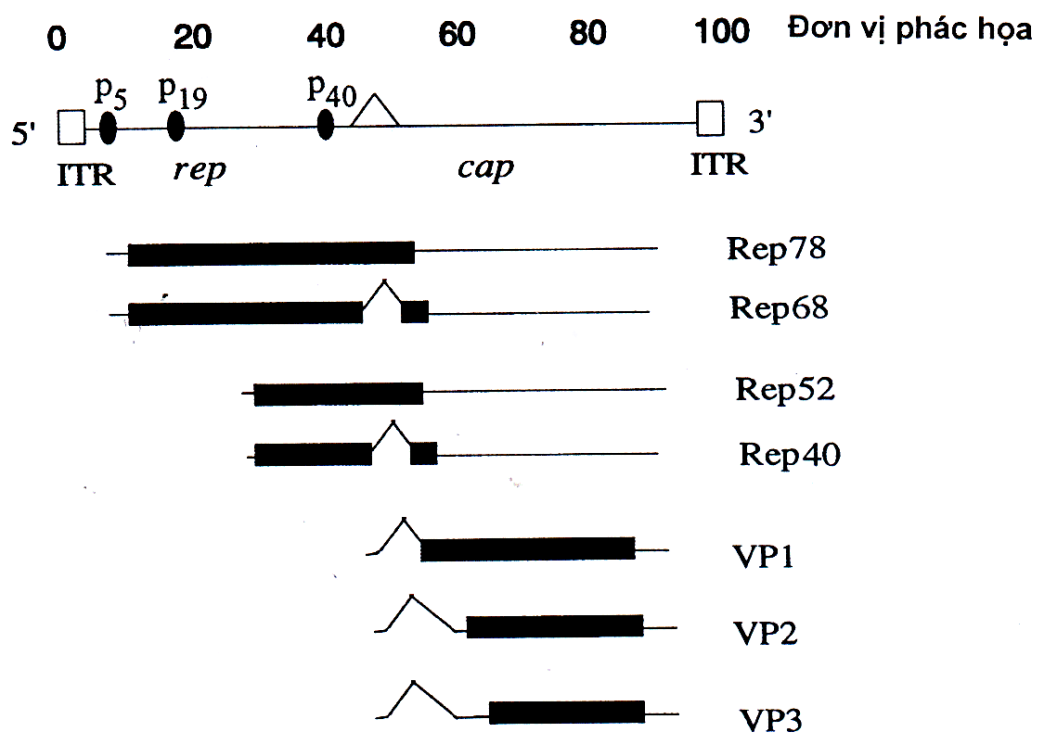


Hình 7.1 Các hạt AAV trên hiển vi điện tử. Các hạt AAV2 được làm tinh khiết ở gradient CsCl (1,41g/ml) các virion thể hiện rõ hình icosahedral 20nm (phóng đại 40.000 lần). Trong ảnh thấy rõ hạt adenovirus lớn nằm cạnh hạt AAV ở band 1,36g/ml (phóng đại 120.000 lần). (Theo Terence R. Flotte và Barrie J. Carter. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

7.2.2 Cấu trúc của AAV và hệ gen của nó

Hệ gen của AAV đã được phân dòng (Laughlin và cộng sự., 1983; Samulski và cộng sự., 1982), được giải trình tự (Srivastava và cộng sự., 1983) và các đặc tính đã được xác định chi tiết (Hình 7.2). Phần tận cùng gồm các trình tự lặp đảo ngược với 145 nucleotide (inverted terminal repeats – ITR). 125 nucleotide phía ngoài của ITR tạo nên sự gấp đôi đảm bảo cho cấu trúc hình cặp tóc khi ở chuỗi đơn.

Các ITR chứa tất cả chức năng tác động dạng *cis* cần cho sự sao chép DNA, sự đóng gói, sự hợp nhất rồi phân cắt và giải thoát kế tiếp (Samulski và cộng sự., 1989). Trong ITR còn có các yếu tố phiên mã, gồm các vị trí sp1 và vị trí khởi đầu (initiator-*inv*) cho sự phiên mã của RNA (Flotte và cộng sự., 1993). Vai trò của các yếu tố này trong chu kỳ sống của virus tự nhiên thì vẫn chưa rõ. ITR còn có các vị trí gắn cho protein Rep68 (đề cập dưới đây) – giữ vai trò quan trọng trong quá trình kết thúc và hợp nhất ở vị trí đặc hiệu.



Hình 7.2 Cấu trúc hệ gen của AAV. Hệ gen AAV được ghi với thang 100 đơn vị map (1 đơn vị map = 1% kích thước hệ gen, vào khoảng 47 bp). Những hộp mở là các đoạn lặp tận cùng đảo ngược (ITR). Các promoter (p_5 , p_{19} , p_{40}) được vẽ như các ellipse đặc. Tín hiệu polyadenylate hóa ở vị trí map 96. Các bản phiên mã RNA từ các promoter AAV nằm ở phía dưới bản đồ DNA với các intron được thêm vào. Vùng mã cho protein là các hộp cứng. Ba protein capsid VP1, VP2 và VP3; bốn protein là Rep78, Rep68, Rep52 và Rep40.

(Theo Terence R. Flotte và Barrie J. Carter. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

Trong ITR có 2 gen virus là *rep* mã cho các protein chức năng cần cho sự sao chép và *cap* mã cho các protein cấu trúc của capsid. Gen *rep* được phiên từ 2 promoter, promoter 5 và promoter 19. Bằng cách sử dụng các promoter này với các bản phiên mã RNA ghép và không ghép người ta đã tạo được 4 protein Rep. Những protein này là Rep78, Rep68, Rep52 và Rep40 (phân loại theo trọng lượng phân tử của chúng). Rep78 và Rep68 có rất nhiều đặc tính: (1) gắn DNA với một trình tự nhận biết Rep đặc hiệu (specific Rep-recognition sequence - rrs) trong mỗi ITR (McCarty và cộng sự., 1994), (2) có hoạt tính của helicase DNA, (3) có hoạt tính endonuclease đặc hiệu chuỗi, đặc hiệu vị trí đối với ITR của AAV khi sao chép và giải thoát DNA, (4) gắn DNA với các trình tự rrs trong trình tự hợp nhất của nhiễm sắc thể 19 (Neitzman và cộng sự., 1994) và (5) có chức năng là chất hoạt hóa và kiểm chế sự phiên mã (Antoni và cộng sự., 1991; Beaton và cộng sự., 1989; Kyostio và cộng sự., 1994). Ba chức năng đầu quan trọng đối với sự sao chép bình thường trong một chu kỳ sinh sản. Việc gắn với rrs trên nhiễm sắc thể 19 có thể giữ vai trò quan trọng trong pha tiềm tàng của chu kỳ sống. Chức năng điều hòa phiên mã rất

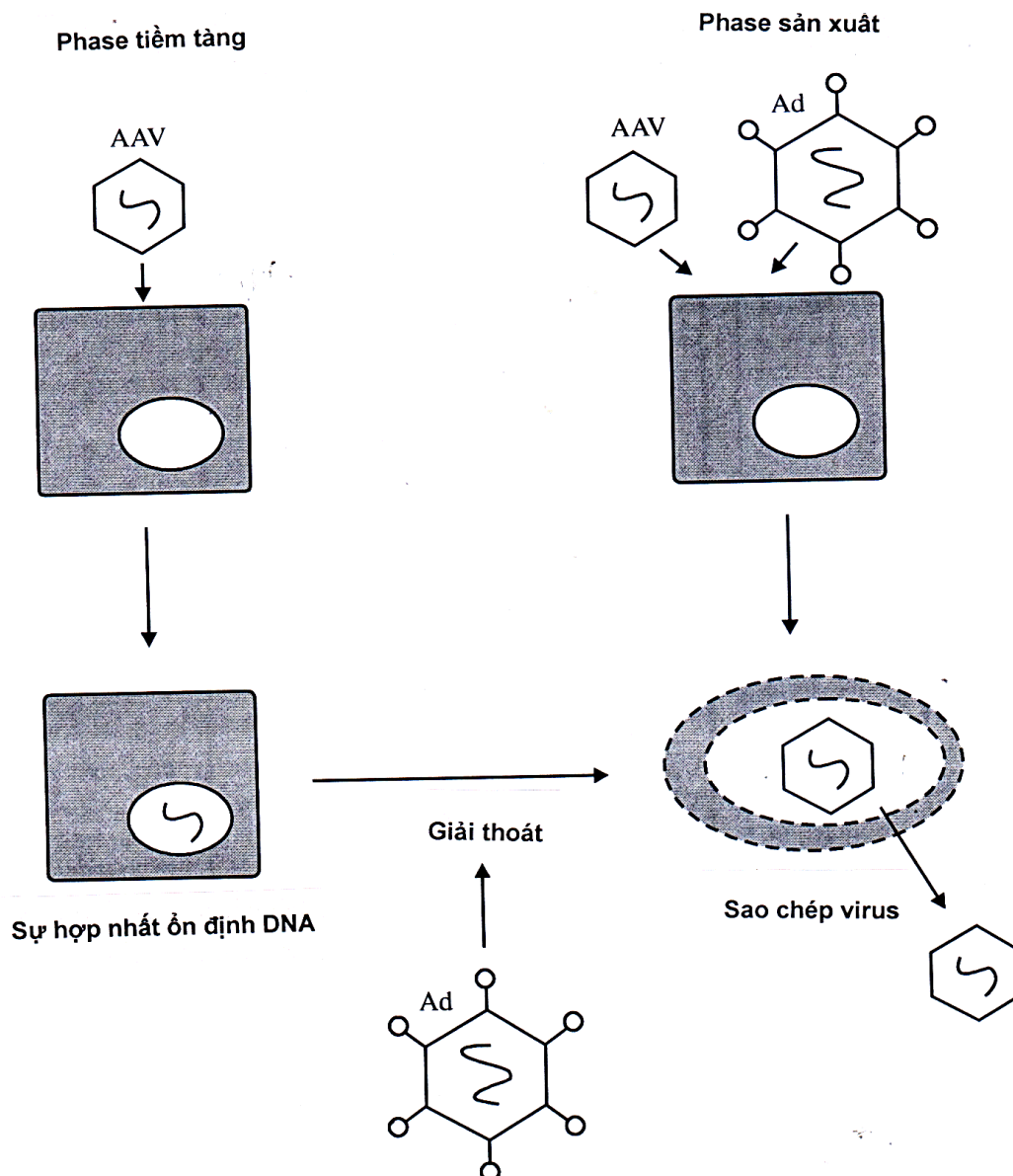
quan trọng đối với việc kiểm chế biểu hiện gen ở pha tiềm ẩn và hoạt hóa nó khi ở pha phiên mã. Rep78 và Rep68 cũng thúc đẩy sự phiên mã của promoter dị loại của các virus khác và các gen của tế bào. Rep78/68 có hoạt tính như một chất kiểm chế tạo khối u (Hermonat, 1991; Krief và cộng sự., 1991). Những chức năng hóa sinh của Rep52 và Rep40 chưa được xác định rõ, mặc dầu sản phẩm gen của chúng cần cho sự tích tụ các bản phiên mã DNA chuỗi đơn khi đã bị thâm nhiễm.

Gen *cap* được phiên mã từ promoter p_{40} để tạo nên 3 sản phẩm protein VP1, VP2, VP3 với các trọng lượng phân tử tương ứng là 85 kDa, 72 kDa và 61 kDa. Với việc sử dụng 2 vị trí tiếp nhận ghép nối khác nhau sẽ tạo được 2 bản phiên mã khác nhau: một bản phiên mã nhỏ mã cho VP1 và một bản phiên mã lớn mã cho VP2 và VP3 (Trempe và Carter, 1998). Những protein này khác nhau về chiều dài các tận cùng amino, tuy nhiên ở vùng mã cho VP3 thì lại đồng nhất. VP3 chiếm 84% protein capsid, cả 3 VP (VP1, VP2, VP3) đều cần thiết cho sự lắp ráp trọn vẹn các hạt virus.

7.2.3 Chu kỳ sống của AAV

Chu kỳ sống của AAV gồm 2 pha, pha sao chép, sinh sản và pha tiềm tàng (Hình 7.3) (Bern, 1990; Carter, 1990). Trong chu kỳ sinh sản, AAV cộng thâm nhiễm với một virus trợ giúp (adenovirus hoặc herpesvirus). Nhờ virus trợ giúp mà sự sao chép của AAV mới xảy ra cùng với sự capsid hóa virion ở các thể hệ con cháu. Các virion này sẽ được giải phóng nếu virus trợ giúp tách khỏi tế bào. Hiệu ứng của virus trợ giúp là trực tiếp. Một số tế bào trong những điều kiện đặc biệt, các yếu tố tế bào có thể giúp cho AAV sao chép mà không cần virus trợ giúp chẳng hạn như khi trị liệu kết hợp cùng các tác nhân gây độc cho gen như bức xạ cực tím (UV), bức xạ gamma hoặc hydroxyureas (Schlehofer và cộng sự., 1986).

Nếu tế bào bị nhiễm AAV mà không có virus trợ giúp thì AAV sẽ đi vào pha tiềm tàng của chu kỳ sống. Vấn đề này nói chung có liên quan tới sự hợp nhất ổn định của dimer đầu – đuôi của hệ gen AAV. Tuy nhiên, thể episome của AAV vẫn tồn tại trong các tế bào thâm nhiễm ít nhất cũng vượt quá con số 100 (Cheung và cộng sự., 1980; Hoggan và cộng sự., 1972). Các đặc tính về sự phát triển và hình thái học tế bào không bị tác động trực tiếp bởi sự tiềm ẩn của AAV. Nếu các tế bào đã thâm nhiễm tiềm tàng lại thâm nhiễm tiếp với virus trợ giúp thì AAV có thể được giải thoát, tức là nó có thể đi vào pha sinh sản của chu kỳ sống.



Hình 7.3 Chu kỳ sống của AAV. Các pha tiềm tàng và pha sinh sản trong chu kỳ sống của AAV (Theo Terence R. Flotte và Barrie J. Carter. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

7.2.4 Tính đặc hiệu vị trí của sự hợp nhất AAV

Một đặc trưng ít thấy của sự tiềm ẩn AAV là khuynh hướng hợp nhất của AAV với một vùng đặc hiệu trên nhiễm sắc thể 19 của người, đó là vị trí AAV-S1. Trong các nghiên cứu về dòng tế bào bất tử thâm nhiễm với AAV, các nhóm nghiên cứu đã phát hiện được các đoạn hợp nhất AAV trong cùng một vùng của nhiễm sắc thể 19 (q13,3-qter) ở 65-70% dòng tế bào (Kotin và cộng sự., 1990, 1991, 1992; Samulski, 1993; Samulski và cộng sự., 1991). Vị trí AAV-S1 với 8,21 kb này đã được giải trình tự và thấy có nhiều yếu tố

quan trọng, bao gồm những tương đồng rrs của AAV và các trình tự nhận biết đầu tận cùng (terminal recognition sequence –trs). Giraud và cộng sự (1994) đã chỉ rõ đoạn 0,5 kb ở vị trí S1 khi hợp nhất với một plasmid của virus Epstein- Barr có episome (EBV) thì cũng đáp ứng đầy đủ như một đích cho sự hợp nhất AAV. Cơ chế của sự hợp nhất có thể liên quan tới protein Rep68 như các số liệu thu được mới đây của Weitzman và cộng sự (1994). Theo những nghiên cứu này thì Rep68 liên kết cả với ITR của AAV cũng như trình tự AAV-S1 để hình thành một phức hợp với chức năng như một chất trung gian của tiền hợp nhất.

7.3 Các vec tơ tái tổ hợp từ AAV

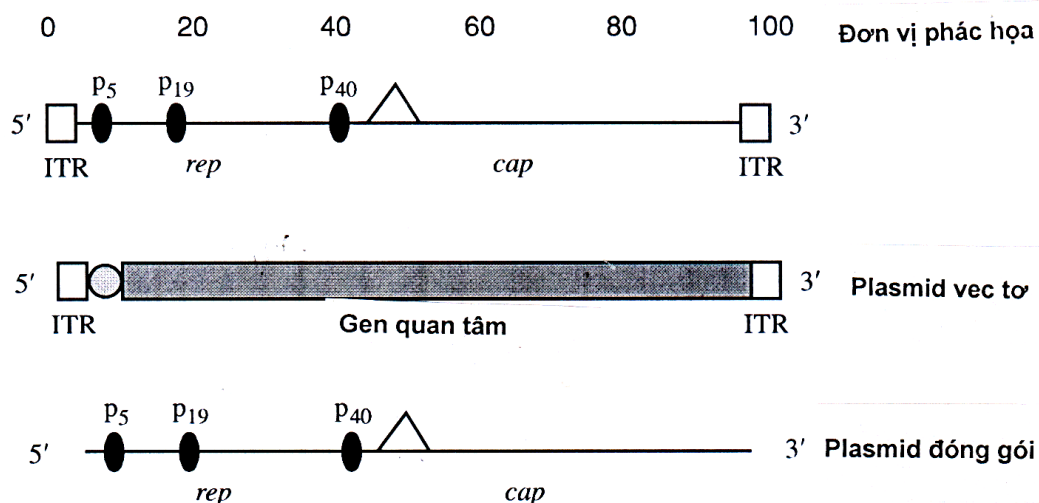
7.3.1 Cấu trúc của các vec tơ AAV tái tổ hợp

Trong các nỗ lực nhằm phát hiện những đặc trưng độc quyền trong chu kỳ sống AAV ở các vec tơ chuyển gen, một số nhóm nghiên cứu đã xây dựng được các vec tơ tái tổ hợp bằng cách loại bỏ đi một số phần bên trong hệ gen AAV trong các plasmid và cài các gen chuyển vào những tế bào nghiên cứu (Flotte và cộng sự., 1992). Trong các nghiên cứu gần đây, Hermonat và Muzyczka, (1984); Samulski và cộng sự., (1989); Trastchin và cộng sự., (1984) thì các vec tơ AAV có nhiều gen *rep* và *cap* đồng thời có bổ sung thêm hoặc AAV dạng hoang dã hoặc có sự grafted các cấu trúc đã bị loại một phần. Những vec tơ này là khả thi cho việc sử dụng AAV như một vec tơ với các tế bào nhân thực, nhưng cũng bị hạn chế do có mặt virus hoang dã nên có hiệu ứng kiểm chế phiên mã qua trung gian gen *rep*.

Samulski và cộng sự., (1989) đã chứng minh rằng có thể tạo được các chế phẩm vec tơ AAV hoàn toàn không có AAV hoang dã nếu dùng các cấu trúc không grafted lên nhau (Hình 7.4). Trong quy trình đóng gói, các cấu trúc vec tơ có chứa gen nghiên cứu được bảo vệ bởi ITR của AAV, khi đó các plasmid “đóng gói” bổ trợ sẽ biểu hiện *rep* của AAV và gen *cap* từ một plasmid thứ hai sẽ cộng thêm nhiễm vào các tế bào đã thêm nhiễm adenovirus. Vì các ITR có chứa các tín hiệu đóng gói nên bất kỳ cấu trúc vec tơ nào có kích cỡ thích hợp (≤ 5 kb) sẽ được đóng gói, khi đó *rep/cap* bổ trợ sẽ không cần biểu hiện các cấu trúc.

7.3.2 Chiến lược đóng gói các vec tơ AAV tái tổ hợp

Để capsid hóa DNA vec tơ AAV tái tổ hợp trong các virion thêm nhiễm cần phải có 5 yếu tố sau: (1) các tế bào cho phép sự sao chép AAV (293 tế bào), (2) một virus trợ giúp (adenovirus), (3) vec tơ AAV tái tổ hợp 5 kb hoặc nhỏ hơn, bao gồm các ITR hỗ trợ các gen chuyển và bất kỳ promoter, yếu tố tăng cường, intron hoặc các yếu tố polyadenylat hóa nào, (4) nguồn protein Rep và (5) nguồn protein capsid. Những yếu tố này có thể được cung cấp bởi các tế bào thêm nhiễm adenovirus lại cộng thêm nhiễm với 2 plasmid khác, một plasmid có chứa DNA vec tơ AAV tái tổ hợp (ITR^+ , rep^- , cap^-) và một plasmid khác bổ trợ các gen AAV (ITR^- , rep^+ , cap^+). Những tế bào này sau đó được ly giải bằng cách làm đông lạnh nhiều lần hoặc bằng các phương pháp vật lý khác để giải phóng các virion đóng gói. Vec tơ AAV đã đóng gói sau này có thể tách khỏi các mảnh vỡ tế bào và virus trợ giúp bằng siêu ly tâm với CsCl.



Hình 7.4 Tổ chức của các vec tơ cơ sở AAV2. Hệ gen AAV với thang đơn vị map được trình bày ở phía trên cùng gồm các ITR như các hộp mở và các promoter (p_5 , p_{19} , p_{40}) được vẽ là các hình ellipse đen. Các plasmid vec tơ (ở giữa) được cấu trúc bằng cách cài một gen lạ vào một thanh hơi tối màu (phần cần quan tâm) và một promoter (vòng tròn hơi tối màu) giữa các ITR với vai trò như các gốc sao chép và các tín hiệu đóng gói. DNA vec tơ được đóng gói trong các hạt AAV thâm nhiễm sau khi đã cộng thâm chuyển với plasmid đóng gói đã loại ITR (phần dưới cùng) sẽ đi vào các tế bào thâm nhiễm adenovirus.

(Theo Terence R. Flotte và Barrie J. Carter. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

Có nhiều giới hạn tiềm ẩn về hiệu lực đóng gói do kỹ thuật cộng thâm chuyển plasmid đơn. Thứ nhất, thiếu (không có) hiệu ứng tiềm tàng về thâm chuyển và vấn đề này sẽ còn được nhân lên do có 2 plasmid đi vào các tế bào đóng gói một cách độc lập. Các dòng tế bào đã được tạo ra có chứa một bản phiên mã ổn định của DNA vec tơ (dạng có thể hồi phục được- rescuable form) (Flotte và cộng sự., 1995) và/ hoặc plasmid biểu hiện *rep/cap* (Clark và cộng sự., 1995). Mức độ biểu hiện của *rep* trong tế bào đích cũng là một yếu tố giới hạn tiềm ẩn. Một thực tế là chính Rep68 có thể điều hòa xuống sự biểu hiện từ các promoter lặp tận cùng dài của HIV (HIV long terminal repeat -LTR) trong 293 tế bào, ở đó promoter này là một cấu trúc hoạt hóa (Flotte và cộng sự., 1995).

7.3.3 Sự tồn tại của DNA vec tơ trong các tế bào đích

Việc sử dụng AAV như một vec tơ tải nạp là dựa trên giả thiết cho rằng AAV tái tổ hợp vẫn còn giữ được các đặc tính xác định của một AAV hoang dã trong việc thiết lập khả năng tồn tại của nó. Trong thực tế có nhiều nghiên cứu đã xác định rằng các vec tơ AAV đã loại trừ *rep*, không có virus hoang dã có thể làm trung gian cho sự biểu hiện gen chuyển một cách ổn định *in vitro* và *in vivo*. Tuy nhiên, những bằng chứng mới đây xác nhận rằng cơ chế sự tồn tại của các vec tơ AAV loại bỏ *rep* có thể khác với AAV hoang dã (Afione và cộng sự., 1994). Các nghiên cứu *in vitro* xác định rằng các vec tơ CFTR của AAV (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) hợp nhất vào locus S1 của

AAV thấp hơn so với AAV hoang dã (Kearns và cộng sự., 1994). Trong một số nghiên cứu *in vivo* ở khỉ rhesus thấy vec tơ CFTR của AAV tồn tại trong các tế bào ngoại biên của phế quản tới trên 3 tháng (Afione và cộng sự., 1996). Trong trường hợp này episome duy trì ở dạng các bản phiên mã DNA chuỗi kép của vec tơ. Những quan sát này đã ủng hộ cho giả thiết cho rằng sự tương tác đặc hiệu giữa rep68, ITR của AAV và trình tự S1 của AAV có liên quan tới sự hợp nhất đặc hiệu vị trí nhờ các AAV hoang dã.

7.3.4 Các yếu tố của tế bào vật chủ tác động tới sự tải nạp vec tơ AAV

Người ta đã xác định được hiệu ứng tăng sinh tế bào vật chủ và biểu hiện gen virus trợ giúp đối với sự tải nạp vec tơ AAV. Lưu tâm tới sự phân chia tế bào, có một vài nghiên cứu đã chỉ rõ rằng DNA vec tơ có thể đi vào các tế bào tĩnh (bất động) (Flotte và cộng sự., 1994; Podsakoff và cộng sự., 1994; Russel và cộng sự., 1994). Hiệu ứng sự biểu hiện gen chuyển rất thay đổi. Một nghiên cứu cho thấy khi các tế bào tĩnh bị thâm nhiễm với vec tơ thì sau đó qua sự chọn lọc mới (neo-selection) sẽ tái lại chu kỳ sống, đồng thời có sự thay đổi chút ít về hiệu ứng tải nạp khi so sánh với các tế bào đang sinh trưởng (Podsakoff và cộng sự., 1994). Một nghiên cứu khác cho thấy khi sự thâm nhiễm nhân lên rất cao thì tế bào phải phân chia chậm lại mới có được mức biểu hiện gen chuyển tương tự như các tế bào sinh trưởng nhanh (Flotte và cộng sự., 1994). Công trình thứ ba lại thấy có sự giảm đáng kể hiệu ứng tải nạp ở các tế bào tĩnh khi so sánh với các tế bào đang sinh trưởng (Russel và cộng sự., 1994). Các nghiên cứu khác có liên quan đã chứng minh có sự khác biệt về hiệu ứng tải nạp giữa các tế bào bất diệt và các tế bào sơ cấp (Harbert và cộng sự., 1995), mặc dầu có một số nghiên cứu khác *in vitro* và *in vivo* lại không thấy có sự khác biệt (Kaplitt và cộng sự., 1994). Sau chót là có thể tăng cường sự biểu hiện bằng bức xạ UV (Alexander và cộng sự., 1994). Một nghiên cứu khác gần đây đã cho thấy sự biểu hiện vec tơ AAV có thể được nâng lên bằng cách trùng hợp thâm nhiễm adenovirus với biểu hiện sản phẩm gen E4- orf6 của adenovirus (Fisher và cộng sự., 1996). Có ý kiến cho rằng hiệu ứng này là do sự tăng cường tổng hợp chuỗi dẫn trong khi chuyển đổi từ DNA chuỗi đơn sang phiên bản DNA chuỗi kép của vec tơ. Đáng tiếc là công trình này không xác định được vai trò nhân lên của thâm nhiễm hoặc động học của sự tổng hợp chuỗi dẫn khi Ad E4- orf6 không được biểu hiện.

7.3.5 Tóm tắt những tiện lợi và bất tiện của các vec tơ tải nạp AAV

Những tiện lợi và bất tiện tiềm ẩn của các vec tơ cơ sở AAV dùng cho gen trị liệu được tóm tắt trong Bảng (7.1). Tiện lợi chính của AAV vượt hơn hẳn các vec tơ virus DNA khác như adenovirus là không có bất kỳ một trình tự mã hóa virus nào trong các vec tơ, do đó tránh cho các tế bào tải nạp khỏi bị nhận dạng và đào thải bởi hệ miễn dịch. AAV tái tổ hợp cũng có thể tiến vào tế bào và tồn tại ở đó với một thời gian khá dài.

Bảng 7.1 Những tiện lợi và bất tiện của các vec tơ AAV dùng cho gen trị liệu

Những tiện lợi	Những bất tiện
1. Không sinh miễn dịch (không có trình tự mã hóa virus)	1. Đòi hỏi phải chuyển thành DNA chuỗi kép (có thể làm chậm sự biểu hiện)
2. Các thành phần capsid không gây phản ứng viêm đối với vật chủ	2. Tần suất hợp nhất giảm vì vắng mặt protein Rep

3. Đưa được DNA vào trong tế bào đích	3. Giới hạn đóng gói nhỏ (4,7 kb cho một lần cài)
4. DNA tồn tại lâu trong tế bào đích	

Bất lợi chính của AAV là AAV vào tế bào như một DNA chuỗi đơn và bắt buộc phải chuyển đổi thành DNA chuỗi kép thì mới biểu hiện được gen chuyển. Điều này có thể làm giới hạn mức độ biểu hiện trong một số tế bào. Cũng như đã đề cập ở trên, các vec tơ AAV không có gen *rep* nên không thể hợp nhất với tần suất cao như AAV hoang dã. Điều này làm hạn chế thời gian biểu hiện gen. Giới hạn về đóng gói của AAV tương đối nhỏ, chỉ khoảng 5 kb. Vì các vec tơ phải chứa các ITR (0,3 kb), do đó đối với một lần cài chỉ cho phép 4,7 kb bao gồm vùng mã hóa gen chuyển, promoter, tín hiệu polyadenylate và các yếu tố điều hòa khác. Mặc dầu việc sản xuất vec tơ AAV vẫn chưa đạt được hiệu quả cao, nhưng trong tương lai sẽ có một vec tơ với nhiều ưu điểm cho phép sử dụng rộng rãi trong lâm sàng.

7.4 Ứng dụng của các vec tơ AAV

Những ứng dụng của các vec tơ chuyển gen của AAV *in vivo* và *in vitro* được tóm tắt trong bảng dưới đây:

Bảng 7.2 Ứng dụng của các vec tơ AAV

<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i>	
Đích tế bào	Loại bệnh	Đích tế bào	Loại bệnh
K562 (erythroid)	Bệnh thiếu máu vùng biển	Phế quản thỏ	Bệnh xơ nang
CD34 + PBL	Bệnh tế bào liềm	Phế quản Rhesus	Bệnh xơ nang
TB tủy xương chuột	Bệnh thuộc hemoglobin	Não chuột	Bệnh Parkinson
IB3-1 (phế quản)	Bệnh xơ nang		
Nguyên bào sợi người não	Bệnh Gaucher' và chứng loạn dưỡng chất trắng		
Dòng lympho CD4+	Bệnh AIDS		
Lympho B bất tử	Bệnh tạo hạt mạn		

7.4.1 Ứng dụng *in vitro*

Các vec tơ tải nạp AAV được nghiên cứu trước tiên ở các dòng tế bào bất tử như Hela, 293 và KB với các gen neomycin phosphotransferase (*neo*) và chloramphenicol acetyltransferase (CAT) (Hermonat và Muzyczka, 1984; Tratschin và cộng sự., 1984, 1985). Các vec tơ này đã được sử dụng trong các dòng biệt hóa xa hơn như dòng K562 erythroleukemia (Walsh và cộng sự., 1992), dòng tế bào ngoại biên của phế quản xơ nang IB3-1 (Flotte và cộng sự., 1992) và một vài dòng tế bào lympho CD4+ (Chatterjee và cộng sự., 1992). Các vec tơ AAV cũng được sử dụng trong các dạng tế bào sơ cấp ở các mô hình *in vitro* với các bệnh đặc biệt.

Nhiều công trình nghiên cứu hướng vào việc sử dụng các vec tơ AAV trong các tế bào từ tủy xương, đó là phương pháp điều trị có triển vọng tốt đối với các bệnh thuộc hemoglobin. Walsh và cộng sự (1992) là những người đầu tiên chứng minh sự biểu hiện được điều hòa cao của gen β globin người trong dòng tế bào K562 erythroleukemia. Về sau cũng nhóm nghiên cứu này lại chứng minh tính khả thi của việc sử dụng vec tơ AAV-globin để tải nạp các tế bào hậu thể có CD4+ từ máu ngoại biên của một bệnh nhân thiếu máu tế bào liềm (Miller và cộng sự., 1994). Những kết quả tương tự cũng thu được với các tế bào có CD34+ từ khỉ rhesus và người nhiễm với vec tơ AAV- β -galactosidase hoặc với AAV hoang dã (Goodman và cộng sự., 1994). Các vec tơ AAV cũng được sử dụng để biểu hiện antisense đối với gen β globin - có thể điều trị hiệu quả bệnh thiếu máu Địa Trung Hải (β thalassemia) do thiếu cân bằng α và β globin nên gây đột biến dòng hồng cầu (Ponnazhagan và cộng sự., 1994).

Các vec tơ AAV cũng được dùng trong các mô hình bệnh tạo máu sơ cấp. Vec tơ AAV đã được sử dụng trong các tế bào tiền thân tạo máu của chuột (Zhou và cộng sự., 1993).

Một nghiên cứu quan trọng khác lại dùng các tế bào từ một bệnh nhân thiếu máu Fanconi, có bổ sung thêm nhóm C (FACC) (Walsh và cộng sự., 1994). Sự tải nạp của các tế bào với vec tơ AAV-FACC đã sửa chữa lại khuyết tật cơ bản trong DNA và phục hồi khả năng hình thành quần thể (khiếm khuyết khả năng này sẽ sinh bệnh). Các vec tơ AAV cũng được dùng để chuyển gen NADPH - oxydase (thiếu hụt gen này có ở các bệnh tạo hạt mãn tính (chronic granulomatous disease) (Thrasher và cộng sự., 1995), gen glucocerebrosidase thiếu hụt ở bệnh Gaucher và gen arylsulfatase A thiếu hụt trong bệnh loạn dưỡng chất trắng não (metachromatic leukodystrophy) (Wei và cộng sự., 1994). Một công trình khác đã mô tả việc sử dụng vec tơ antisense AAV để ức chế sự sao chép của HIV-1 trong các dòng tế bào lympho, đó là phương pháp điều trị hứa hẹn đối với bệnh AIDS (Chatterjee và cộng sự., 1992).

Một vài nghiên cứu đã xác định khả năng ứng dụng của AAV như là một vec tơ chuyển gen cho bệnh xơ nang. Các vec tơ AAV biểu hiện CFTR được thiết lập từ các thành phần nhỏ của promoter AAV nội sinh làm thuận lợi cho sự đóng gói ở vùng mã cho CFTR 4,5 kb, cùng với 0,3 kb của ITR đã kiến tạo được kích cỡ vec tơ gần với giới hạn đóng gói của AAV (Flotte và cộng sự., 1993). Các cấu trúc vec tơ AAV-CFTR được tạo ra có thể đóng gói và tải nạp dòng tế bào IB3-1 khiếm khuyết CF, kết quả là sửa chữa được kiểu hình khiếm khuyết vận chuyển chloride. Điều thú vị là CFTR biểu hiện độ dẫn điện của chloride theo một đường thẳng và lập lại đáp ứng cAMP của kênh chính lưu chloride (Egan và cộng sự., 1992; Schwiebert và cộng sự., 1994). Việc chứng minh được khả năng sửa chữa kiểu hình trong nuôi cấy không chọn lọc đã khích lệ các nghiên cứu *in vivo* về sự chuyển gen AAV-CFTR.

7.4.2 Ứng dụng *in vivo*

Các công trình đã xuất bản về chuyển gen *in vivo* với các vec tơ AAV đều hướng vào não và phổi – đó là các cơ quan đích có tiềm năng. Kaplitt và cộng sự đã chứng minh rằng các vec tơ AAV biểu hiện gen *lacZ* trên 3 tháng sau khi tiêm trực tiếp vào não chuột. Họ cũng chỉ rõ rằng vec tơ AAV khi biểu hiện gen tyrosine hydroxylase (TH) đã có tác động tới việc sửa chữa một phần kiểu hình trên mô hình chuột về bệnh Parkinson. Các vec tơ AAV-CFTR đã được nghiên cứu trên phổi thỏ (Flotte và cộng sự., 1993) và trên khỉ rhesus (Afione và cộng sự., 1996) –khi các gen được chuyển vào qua đường phế quản. Trong mỗi trường hợp, sự tồn tại lâu dài của DNA vec tơ và sự biểu hiện của RNA đều phải đảm bảo không gây độc tính. Những nghiên cứu này là cơ sở cho pha I lâm sàng của AAV-CFTR được đưa qua mũi và phổi những bệnh nhân xơ nang (người lớn) khi mới mắc bệnh (Flotte và cộng sự., 1996).

7.5 Vấn đề an toàn

AAV về cơ bản là một virus thường thâm nhiễm trên người nhưng không gây bệnh và các vec tơ AAV khá an toàn trong các test *in vivo*. Tuy nhiên, điều quan trọng là cần phải lưu tâm về tính an toàn với các thử nghiệm lâm sàng và tiền lâm sàng sắp tiến hành. Tính an toàn với các vec tơ AAV bao gồm: (1) những rủi ro tiềm ẩn của vec tơ gen trị liệu đối với những người dự định sẽ trị liệu, tức là những vấn đề liên quan tới bệnh nhân và (2) những rủi ro có thể cũng như sự phát tán virus tái tổ hợp sang những người khác, tức là môi trường tiếp xúc.

7.5.1 Những vấn đề liên quan tới tính an toàn

Những số liệu *in vitro* gần đây đã chứng minh không thấy có độc tính ở các vec tơ AAV khi thí nghiệm trên phổi thỏ và khỉ rhesus hoặc trên não của chuột. Vì vậy, đối với tính an toàn của vec tơ chỉ còn là việc so sánh những vấn đề lý luận cũng như kinh nghiệm đạt được giữa AAV và các vec tơ virus khác.

Về khả năng gây đột biến ghép và tạo khối u cũng đã được quan tâm bởi vì các vec tơ loại bỏ *rep* đã hợp nhất không đặc hiệu với một số tế bào trong quần thể đích. Tuy nhiên, DeLaMaza và Carter (1981) cũng đã kiểm tra về tiềm năng gây khối u của cả *rep*⁺AAV và *rep*⁻AAV trên mô hình chuột lang mới sinh. Kết quả cho thấy không có bằng chứng nào về sự kích thích tạo khối u bởi virus. Trên thực tế cả *rep*⁺AAV và *rep*⁻AAV đều có tiềm năng ức chế gây khối u của adenovirus type 12. Xa hơn nữa khi theo dõi dài hạn cũng không có bằng chứng về những biến đổi tăng sản ung thư ở các động vật liên quan tới sự chuyển gen *in vivo* như đã đề cập ở trên (Flotte và cộng sự., 1993; Kaplitt và cộng sự., 1994). Theo kinh nghiệm thì rủi ro về đột biến đối với các vec tơ này là thấp.

Về khả năng gây viêm nhiễm cảm ứng bởi vec tơ và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào thì thấy tăng lên bởi vì khi các vec tơ adenovirus được đưa vào phổi thì thấy có đáp ứng viêm (Simon và cộng sự., 1993) và có sự loại trừ miễn dịch đối với các tế bào tải nạp (Yang và cộng sự., 1994). Những vấn đề này đã được nghiên cứu trực tiếp trên khỉ rhesus với các vec tơ AAV (Conrad và cộng sự., 1994). Việc chuyển giao qua khí quản AAV-CFTR tới biểu mô phế quản cũng không thấy có kèm theo viêm nhiễm theo như các phân tích dịch phổi (bao gồm việc đếm tế bào, đo mức interleukin -6 (IL-6) và interleukin -8 (IL-8), các nghiên cứu phóng xạ, chức năng phổi và giải phẫu bệnh học). Những nghiên

cứu này còn xem xét cả liều lượng vec tơ (1×10^{11} hạt, kéo dài 10-180 ngày). Có hai khác biệt cơ bản giữa AAV và Ad là: (1) protein capsid AAV ít độc hơn và không gây viêm nhiễm và (2) khi vắng mặt trình tự mã hóa virus trong các vec tơ AAV thì sẽ tránh cho các tế bào tải nạp trở thành đích đối với miễn dịch tế bào.

7.5.2 Vấn đề an toàn môi trường

Muốn được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng, các vec tơ AAV phải đảm bảo an toàn cho người. Với các thao tác *ex vivo*, tiêu chuẩn an toàn sinh học phải được đặt lên đầu tiên cũng như các vấn đề liên quan tới sự chuyển gen bao gồm: (1) AAV rơi khỏi cơ thể ngay sau khi được trị liệu và (2) cứu thoát và loại bỏ vec tơ với những người sau khi trị liệu bằng vectơ AAV lại nhiễm AAV hoang dã và adenovirus. Tất cả những vấn đề này đã được nghiên cứu trên mô hình khỉ rhesus (Afione và cộng sự., 1996). Về việc giải thoát cho bệnh nhân cũng có nhiều cách khác nhau như thay đổi vị trí và trình tự của Ad, wt-AAV và các vec tơ AAV-CFTR. Tuy nhiên trong đa số các trường hợp vẫn chưa thấy các vec tơ bị rơi ra bên ngoài môi trường. Nhưng khi tiêm với liều lượng cực lớn (10^{10} hạt) AAV hoang dã sau đó là AAV-CFTR ở cùng một vị trí trên đường hô hấp rồi lại cho nhiễm Ad thì phát hiện ở phổi sau 6 ngày trị liệu có một lượng nhỏ AAV-CFTR bị rơi rụng. Những phát hiện này đã khẳng định rằng những rủi ro của AAV đối với môi trường nói chung là thấp.

Chương VIII

NHỮNG TIẾN BỘ ĐẠT ĐƯỢC TRONG CÁC VEC TƠ HSV CÔNG NGHỆ HÓA DÙNG ĐỂ CHUYỂN GEN TỚI HỆ THẦN KINH

8.1 Mở đầu

Gen trị liệu cho chúng ta một điểm đến đầy hứa hẹn với việc điều trị các bệnh thuộc hệ thần kinh trung ương (central nervous system – CNS) - ở đó có một hàng rào ngăn cách giữa máu và não bộ, ngăn cản sự ra vào của các chất. Tuy nhiên, do sự chuyên hóa vùng và chuyên hóa tế bào của não bộ nên đòi hỏi thuốc phải được chuyển đến những vùng đặc biệt của não cũng như tới các dạng tế bào cấu thành. Những bệnh thần kinh hiện nay đang được trị liệu bằng gen như các bệnh thoái hóa neuron, bệnh u não và các hội chứng tự miễn dẫn đến sự hủy hoại các thành phần mô thần kinh. Tiến triển của các bệnh thoái hóa neuron mãn tính như bệnh Alzheimer và Parkinson có thể được cải thiện bởi các sản phẩm tiết ra tại chỗ của các yếu tố thần kinh làm ngăn cản sự thoái hóa neuron hải mã (hippocampal) hoặc các neuron dopaminergic của bó thể vân chất xám. Nhờ các thí nghiệm trên mô hình động vật nên đã sáng tỏ rằng tiến triển của bệnh có thể được ngăn ngừa bởi neurotrophin đặc hiệu (yếu tố tăng trưởng thần kinh – nerve growth factor – NGF) hoặc các yếu tố thần kinh đệm (glial- derived neurotrophic factor –GDNF) tác động vào các tiêu điểm, trong trường hợp này sẽ đòi hỏi vec tơ phải biểu hiện được các cấu thành của neurotrophin với mức thấp trong các tế bào đặc biệt ở vùng cần quan tâm. Các khối u não đại diện cho lớp thứ hai của các bệnh thần kinh cũng có thể được điều trị bằng cách biểu hiện cục bộ và nhanh chóng các phân tử trị liệu như các chất tăng cường miễn dịch thu hút các tế bào thâm nhiễm tiêu diệt khối u và các tế bào T miễn dịch đặc hiệu khối u, các phân tử gây độc tế bào như các yếu tố gây hoại tử khối u hoặc các enzyme như thymidine kinase (TK) có thể hoạt hóa cục bộ các thuốc kháng ung thư. Các thuốc được hoạt hóa như ganciclovir và 5 fluorouracil có thể tiêu diệt được các tế bào đang phân chia nằm sát cạnh bằng cách truyền từ tế bào này sang tế bào kia như trường hợp thứ nhất hoặc ở trường hợp thứ hai thuốc sẽ được giải phóng tại một vị trí nào đó (cục bộ).

Bệnh đa xơ cứng do mất myelin tiến triển gây ra bởi sự tấn công qua trung gian miễn dịch, đại diện cho các bệnh tự miễn có thể điều trị hiệu quả bởi sự biểu hiện cục bộ các cytokine kích thích miễn dịch hoặc các chất ức chế cytokine.

Các gen trị liệu có thể được đưa vào tế bào của hệ thần kinh bằng cách truyền trực tiếp gen *in vivo* hoặc *ex vivo* với việc ghép các tế bào tải nạp. *Ex vivo* bao gồm việc đưa gen

trị liệu tới các quần thể tế bào như neuron thai nhi hoặc neuron bất tử, các tế bào gốc của hệ thần kinh tổ tiên đa năng, các tế bào ưa crom thượng thận, tế bào thần kinh đệm hoặc nguyên bào sợi, những tế bào này sau đó có thể nuôi cấy được *in vitro* rồi cấy lại vào vật chủ, nó có thể nằm tại chỗ hoặc di cư tới các vị trí khác. Việc chuyển gen *in vivo* đòi hỏi vec tơ phải có khả năng chuyển giao được các gen trị liệu trực tiếp vào các tế bào của hệ thần kinh. Vấn đề chính trong việc phát triển các vec tơ trị liệu *in vivo* thường liên quan tới đích và việc chuyển giao tới các tế bào thích ứng, độc tính hay sự bất ổn định tiềm tàng của vec tơ, khả năng đáp ứng miễn dịch của vật chủ ngăn cản việc tiến vào của vec tơ hoặc sự loại thải các tế bào tải nạp vec tơ, cũng như mức độ và thời gian kéo dài sự biểu hiện gen chuyển trong trị liệu.

Nhiều thay đổi về phương pháp đã được thử nghiệm trong việc chuyển gen tới các neuron, các tế bào thần kinh đệm. Vấn đề này bao gồm các nội dung: các vec tơ virus, sự ném bom của cộng hợp DNA với các hạt vàng (gold particle-DNA conjugate bombardment), tiêm trực tiếp DNA plasmid, liposome đơn lẻ hay cùng các tác nhân kích thích sự tổng hợp. Các vec tơ đã được chứng minh là phương tiện vận chuyển hiệu quả: virus herpes simplex có hệ gen khiếm khuyết về sao chép (HVS), HVS amplicon, adenovirus (AV), virus adeno liên hợp (AAV) và các vec tơ từ tái tổ hợp oncovirus của chuột- lentivirus người (HIV- MoMuLV) cũng đã được thử nghiệm ở các neuron trong môi trường nuôi cấy và trên động vật. Các virus cơ sở này khác nhau về tính hướng, sự trường tồn và mức độ biểu hiện gen, những rủi ro bởi cảm ứng hình thành các chất độc, khả năng tải nạp tối đa và tạo ra các kho chứa các virus có độ chuẩn cao nhưng không còn các virus có khả năng sao chép trong tạp chất. Vì HVS tồn tại một cách tự nhiên lâu dài trong các neuron của hệ thần kinh trung ương và hệ thần kinh giao cảm (parasympathetic nervous system –PNS), một trạng thái trong đó đóng cửa hoàn toàn sự biểu hiện gen vòng tiêu tố (lytic cycle expression) nên tránh được “sự trông nom” miễn dịch” trong khi vẫn tiếp tục sản sinh hàng loạt các bản phiên mã liên hợp tiềm ẩn (latency-associated transcripts – LAT), vì thế có khả năng tạo được các vec tơ hệ gen HSV không có khả năng sao chép hoặc biểu hiện các sản phẩm gen kháng nguyên virus và độc tính tế bào khi khai thác các yếu tố promoter LAT tự nhiên cho sự biểu hiện gen do sự nói rộng các tính chất sinh học tự nhiên của virus này .

8.2 Đặc điểm sinh học của HSV

HVS-1 là một virus hướng thần kinh tự nhiên thông thường, nó tồn tại lâu dài và thường là lành tính đối với vật chủ là người. Virus này sao chép trong các tế bào ngoại biên của mô giác mạc và miệng, nó tràn vào những đầu tận của dây thần kinh và vào các hạch cảm giác do sự dịch chuyển lùi lại sợi trục (Hình 8.1). HVS có khả năng duy trì được nhiều bản phiên mã các hệ gen virus như các episome nằm yên (quiescent episome) trong các neuron cảm giác của hệ thần kinh ngoại biên sau nguyên phân. Virion HVS có hệ gen DNA chuỗi kép 152 kb đóng gói hình viên trong capsid icosadeltahedral. Hệ gen này có 2 đoạn độc quyền (U_L và U_S), mỗi đoạn được đặt bên sườn một bộ các đoạn lặp tận cùng bên trong. Bao quanh capsid là một màng bọc, một khối protein vô định hình với ít nhất 6 protein virus, gồm protein shut-off của virion (virion host shut-off –vhs), protein này điều hòa xuống sự tổng hợp protein tế bào vật chủ và VP16 hoặc yếu tố cảm ứng tải nạp Π (Π – transinducing factor – Π – TIF), một protein tương tác với các yếu tố tế bào Oct-1 và HCF hoạt hóa một lớp trung gian sớm các gen virus. Những protein này vào nhân cùng

với virus và tham gia vào quá trình thâm nhiễm. Các virion thâm nhiễm có lớp vỏ sinh ra từ sự nảy chồi của các hạt qua màng nhân trong.

Lớp vỏ có ít nhất 10 glycoprotein được mã bởi virus, nó hợp nhất vào lớp vỏ lipid kép để có thể gắn, thâm nhập và trải rộng từ tế bào này sang tế bào khác ở nhiều dạng tế bào.

Một đặc tính đáng lưu ý về chu kỳ ly giải virus là sự nối tiếp có trật tự theo thời gian của sự biểu hiện gen virus. α – TIF trong màng virus cảm ứng sự biểu hiện lớp đầu tiên các gen virus IE hoặc β . Bốn trong số 5 gen β (ICP0, ICP4, ICP22 và ICP27) có liên quan tới sự điều hòa phiên mã và hậu phiên mã lớp tiếp theo của các gen virus hoặc các gen β . Gen β cung cấp các enzyme cho sự chuyển hóa nucleotide và sự sao chép DNA. Lớp cuối cùng của các gen virus được biểu hiện là các gen γ cần cho sự sao chép DNA cũng như sự biểu hiện các sản phẩm của gen IE. Các gen này mã cho các sản phẩm protein tạo nên các thành phần capsid icosahedral virus, màng bọc và glycoprotein vỏ.

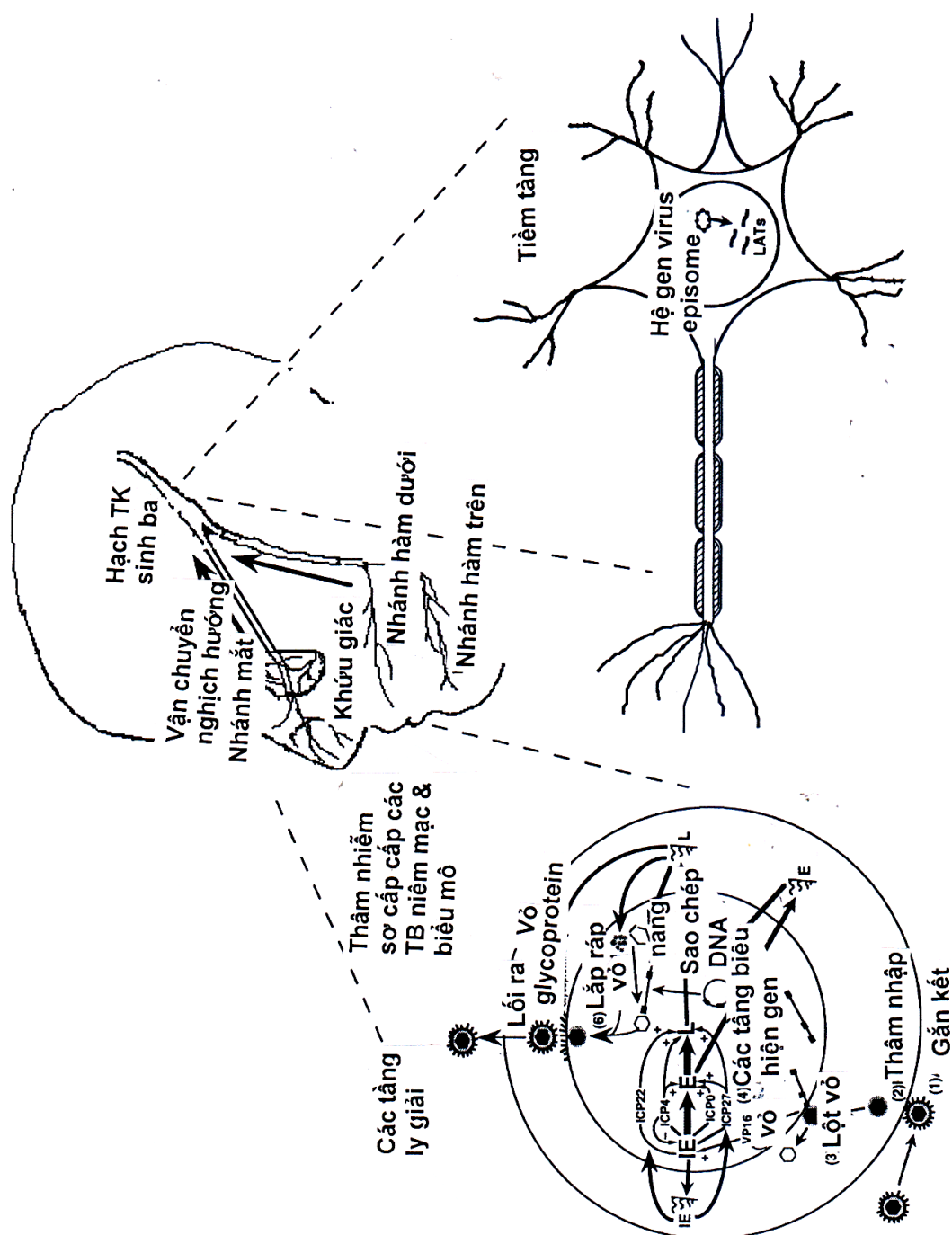
Một tầng tương tự về sự biểu hiện gen virus cũng xảy ra trong thân tế bào thần kinh hạch cảm giác và các hạt virus thâm nhiễm có thể được phát hiện sau 7 ngày thâm nhiễm. Tuy nhiên, trong các neuron, sự biểu hiện gen ly giải virus có thể bị nén lại bởi một cơ chế chưa được rõ, theo đó hệ gen virus còn duy trì cả episome gắn với nucleosome lớn và ở trạng thái nằm yên trong nhân tế bào. Những gen tiềm tàng này có thể cảm ứng tái hoạt do các kích thích như stress hay bức xạ cực tím (UV). Trong hoạt hóa, các nucleocapsid được chuyển ngược lại phía ngoại biên, ở đó hồi phục lại sự sao chép tức thì trong các tế bào biểu mô bì. Ở người, biểu thị của sự tái hoạt virus là viêm giác mạc do herpes hoặc các vết thương ẩn nấu điển hình, điều này tùy thuộc vào vị trí tái diễn. Vì vậy, virus này có thể bị dao động giữa 2 trạng thái trong vật chủ: ngủ kéo dài hay “tiềm ẩn”, nó bị ngắt quãng bởi các thời kỳ sao chép tích cực của virus hoặc trong một số cá thể virus này có thể ngủ trong suốt đời sống của vật chủ mà không cần có sự tái thâm nhiễm.

Khi ở trạng thái tiềm ẩn sự phiên mã virus bị giới hạn bởi một bản phiên mã độc quyền có nguồn gốc ở vùng 10 kb định vị ở các đoạn lặp tận cùng bên trong (internal repeats – IR and terminal repeats – TR) của hệ gen virus (Hình 8.2). Hai bản phiên mã 2,0 và 1,5 kb được tích tụ trong các hạch cảm giác bị thâm nhiễm tiềm ẩn, đó là các bản phiên mã hợp nhất tiềm ẩn (latency – associated transcript – LAT). Những bằng chứng gần đây cho thấy các LAT 2,0 và 1,5 kb là các intron ổn định có nguồn gốc từ một bản phiên mã sơ cấp không ổn định 8,3 kb.

Vai trò chức năng của LAT hiện vẫn chưa rõ. Việc loại bỏ vùng LAT không làm mất đi khả năng của virus đối với việc sao chép hoặc thiết lập trạng thái tiềm ẩn, nhưng làm chậm lại hoặc làm giảm khả năng tái hoạt của virus. Một công trình gần đây khi sử dụng các tế bào hạch dây thần kinh sọ đã chứng minh được rằng chức năng của LAT là làm tăng số lượng neuron mà virus có thể tồn tại ở đó. Bởi vậy, những đột biến tác động tới sự biểu hiện LAT không chứng minh được là ngăn cản sự thiết lập tiềm ẩn, vì vậy có thể khai thác vùng điều hòa promoter LAT để hướng vào sự biểu hiện đặc hiệu tiềm ẩn của gen trị liệu được cài vào LAT.

Hình 8.1 Sự thâm nhiễm HVS của vật chủ. Sự thâm nhiễm HSV sơ cấp của các tế bào ngoại biên hoặc niêm mạc vùng miệng mặt của vật chủ, kết quả là các hạt virus con cháu thâm nhiễm một cách nhẹ nhàng chạm trán với các đầu tận cùng sợi trục do vậy kích thích vị trí thâm nhiễm sơ cấp. Sự dịch chuyển lùi về phía sợi trục của virus tới thân tế bào thần kinh trong các hạch dây thần kinh sọ

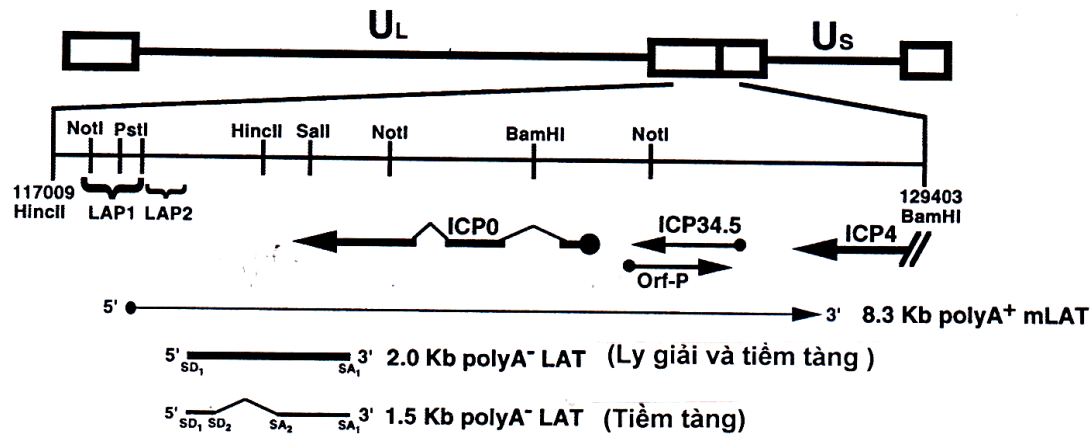
có thể dẫn tới ly giải sự sao chép hoặc thiết lập sự thâm nhiễm lặng hay tiềm ẩn. Trong trạng thái tiềm ẩn hệ gen virus vẫn còn cả episome vòng, do vậy vẫn có sự phiên mã để có các bản phiên mã hợp nhất tiềm ẩn (yên lặng) LAT. Virus này từ trạng thái yên lặng có thể được kích thích tái hoạt rồi đi vào vòng ly giải và tạo ra các virion con cháu tiến tới ngoại biên bằng sự chuyển dịch lùi lại sợi trục, ở đó có sự thâm nhiễm tái diễn dẫn tới tổn thương có thể nhìn thấy được.(trang sau)
(Theo M. Karina Soares, William F. Goins, Joseph C. Glorioso và David J. Fink. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).



8.3 Phát triển các vec tơ HSV cho hệ thần kinh

Trong việc chế tạo các vector virus người ta phải quan tâm tới tính hướng mô đặc hiệu, trạng thái hợp nhất kháng lại episome của các vec tơ virus, độ độc/ hoặc tính kháng nguyên, sự trường tồn và mức biểu hiện gen mong muốn, những rủi ro về sinh khối u, khả năng tải nạp tối đa và trong một số trường hợp phải tính tới khả năng tạo ra các kho chứa virus có độ chuẩn cao nhưng không chứa các virus sao chép trong các tạp chất.

Tính hướng tự nhiên của HSV và hệ gen của nó ở dạng episome trong các tế bào đích là 2 đặc tính vốn có của virus này mà nó trở thành một vec tơ hấp dẫn cho gen trị liệu hệ thần kinh. Dưới đây là những tóm tắt về những tiến bộ đạt được trong việc công nghệ hóa các vec tơ HSV dùng trong trị liệu hệ thần kinh khi sử dụng các virus tái tổ hợp.



Hình 8.2 Mô tả sự biểu hiện các gen tiềm ẩn của HSV. Sự định vị các bản phiên mã (LAT) của HSV có liên quan tới các RNA của gen ly giải ICP0, ICP34,5, Orf-P và ICP4 trong hệ gen gốc. Các promoter LAP1 và LAP2 hoạt tính tiềm tàng có liên quan tới đầu 5' của mLAT 8,3 kb và intron LAT 2,0 kb. Khi sử dụng intron LAT 2,0 kb có nguồn gốc từ mLAT 8,3 kb đã xác định được các tín hiệu ghép (SD₁/SA₁) chất cho/ chất nhận khi thâm nhiễm tiềm tàng và ly giải. LAT 1,5 kb là kết quả của việc ghép nối intron ghép đôi (twintron) 0,5 kb từ LAT 2,0 kb nhờ sử dụng các tín hiệu ghép nối SD₂/SA₂ độc quyền cho trạng thái tiềm tàng.

(Theo M. Karina Soares, William F. Goins, Joseph C. Glorioso và David J. Fink. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

8.3.1 Loại trừ các chức năng phụ để nâng cao khả năng của các gen ngoại lai

Hệ gen HSV có 84 khung đọc mở, phần nhiều được bổ sung bởi protein tế bào vật chủ và thêm các chức năng phụ cho việc sao chép của virus và sự phát tán trong vật chủ. Bởi vậy người ta có thể tạo ra được các tái tổ hợp virus trong đó các gen không thiết yếu của HSV -1 sẽ được thay thế bằng những hợp biểu hiện gen chuyển mà không bị ảnh hưởng bởi khả năng sao chép của virus khi nuôi cấy. Các vec tơ đã có thay đổi các chức năng phụ không thiết yếu cá biệt thì có khả năng sao chép trong các tế bào đang phân chia (các tế bào khối u) nhưng không sao chép được trong các tế bào hậu gián phân (các neuron não bộ). Chẳng hạn như, những virus đã loại bỏ enzyme tổng hợp DNA mã hóa các gen (TK hoặc ribonucleotide reductase) hoặc gen có liên quan tới sự gây độc thần kinh (ICP34,5) sẽ được phát triển trong các neuron hậu gián phân trong não bộ và vì vậy làm giảm khả năng sinh bệnh khi được tiêm chủng. Mặc dù những vec tơ này vẫn còn độc tính cao đối với tế bào nuôi cấy nhưng độc tính tế bào *in vivo* lại giảm nên chúng đã được sử dụng như các tác nhân hủy khối u khi điều trị bệnh u não vì bản chất phân chia tích cực của các tế bào khối u đã cung cấp một cách thích ứng các nucleotide và bộ máy tổng hợp

DNA cho sự sao chép của virus và sau đó ly giải các tế bào khối u. Tuy nhiên, những virus này cực kỳ độc đối với các tế bào đang phân chia trong nuôi cấy cũng như đối với phần lớn các dạng tế bào *in vivo* vì thế việc sử dụng nó trong gen trị liệu bị hạn chế rất nhiều. Những gen không thiết yếu có thể được loại bỏ khỏi hệ gen virus để phòng ngừa sự sao chép khi nuôi cấy và việc loại trừ các gen phụ đặc biệt có thể làm suy giảm đáng kể sự sao chép. Đoạn U_S của HSV-1 có 13 gen, trong đó chỉ có một gen cần cho sự phát triển của virus trong nuôi cấy mô (U_{S6} mã cho gD). Khi loại trừ đoạn DNA này sẽ giúp cho gen thiết yếu độc quyền trong locus U_L tạo nên một không gian hệ gen (~ 20 kb) để cài được các hộp lớn hoặc đa gen. Thêm vào đó, đoạn U_S mã cho 4 glycoprotein không thiết yếu (gJ, gG, gI và gE), nếu bị loại trừ nó sẽ đào thải tiềm năng gắn của virus cũng như đáp ứng miễn dịch của vật chủ đối với vỏ virus. Khi loại trừ một khoảng từ U_{S1} đến U_{S5} và một phần đoạn lặp IR_S sẽ tạo được một tái tổ hợp giảm khả năng sinh bệnh *in vivo*. Tuy nhiên, nhiều đoạn U_S vẫn còn tồn tại trong tái tổ hợp này. Gần đây người ta đã công nghệ hóa được một tái tổ hợp trong đó đã loại trừ 8,5 kb đoạn từ U_{S3} tới U_{S11} trong một thể đột biến mà gD đã được thay thế bằng gC. Virus này đã bãi bỏ hoàn toàn sự phát tán từ tế bào này sang tế bào khác *in vitro* và không có hiệu ứng phát tán PNS sau khi tiêm chủng qua giác mạc. Tuy nhiên, việc loại trừ đoạn U_S mã cho U_{S3} đến U_{S11} có thể làm giảm sự nhận dạng miễn dịch của vec tơ này do đã loại bỏ kháng nguyên đích kháng virus tiềm tàng, trong khi đó lại tăng khả năng tải nạp của vec tơ.

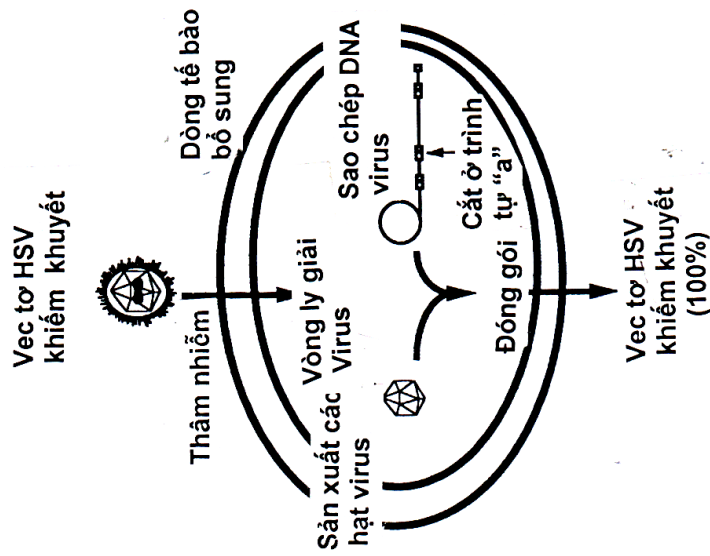
8.3.2 Độc tính tế bào của các vec tơ hợp nhất

Mặc dầu các vectơ HSV có hệ gen thuộc thể hệ thứ nhất (Hình 8.3A) đã loại bỏ ICP4 có thể tải nạp tốt cho tế bào nuôi cấy và các neuron *in vivo*, nhưng lại có độc tính cao cho các tế bào cơ và neuron sơ cấp cũng như các tế bào đang phân chia khác (other non-permissive dividing cells) trong nuôi cấy thậm chí ngay cả khi thâm nhiễm thấp. Có lẽ là sự biểu hiện các sản phẩm gen HSV vẫn còn cả IE nên nó vẫn tiếp tục biểu hiện các thể đột biến ICP4⁻ do đó làm thay đổi sự phiên mã (ICP0, ICP22, ICP27) gây nên độc tính, bởi vì cả sự biểu hiện gen sớm và muộn đều làm giảm rất nhiều hoặc làm mất hẳn đột biến loại trừ ICP4 và khi trị liệu bằng interferon sẽ phá vỡ biểu hiện gen IE gây độc của virus. Các virus bất hoạt bằng UV giảm đáng kể độc tính tế bào trong các tế bào mô cơ và các tế bào khác trong nuôi cấy. Gen IE thứ 4 biểu hiện vượt trội khi vắng mặt ICP4 là ICP47. ICP47 không gây độc tế bào bởi vì hoạt tính của ICP47 có liên quan tới việc trợ giúp virus xâm hại hệ thống miễn dịch vì nó can thiệp vào trình diện kháng nguyên lớp I của hệ thống hòa hợp tổ chức chính. Một gen gây độc tế bào tiềm ẩn khác là U_{L41} mã cho protein màng bọc (vhs) đáp ứng sự làm ngừng (shut-off) và làm mất ổn định cho mRNA tế bào chủ. Khi loại trừ bất kỳ gen nào trong số 4 gen IE hoặc vhs thì cũng không làm giảm được độc tính. Tuy nhiên, trong các thí nghiệm thâm chuyển thì ICP4, ICP0, ICP22 và ICP27 đều gây độc đối với tế bào, điều đó chứng tỏ rằng ICP0, ICP22 và ICP27 đều góp phần tạo nên độc tính ở các vec tơ tái tổ hợp thể hệ I thiếu ICP4. Vì vậy cần phải loại bỏ cả 4 sản phẩm gen hoạt chuyển IE trong tổ hợp để loại bỏ độc tính qua trung gian vec tơ làm cho vec tơ có thể chuyển gen tới tế bào với mức thâm nhiễm cao mà không làm chết tế bào.

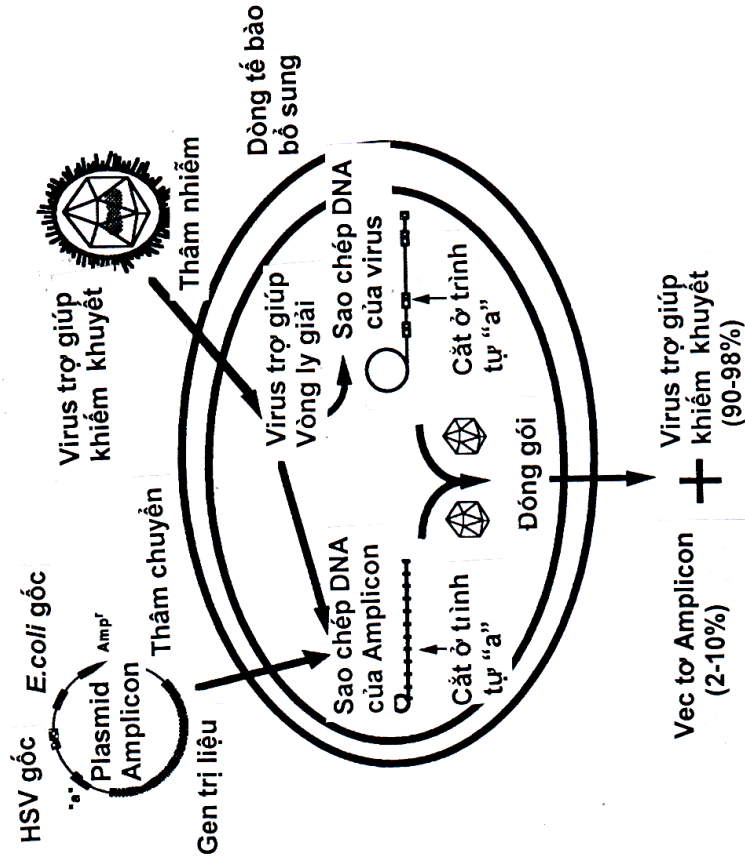
Hình 8.3 Các chiến lược tạo vec tơ. (A) sản xuất các vec tơ HSV có hệ gen khiếm khuyết được công nghệ hóa trong các dòng tế bào để cung cấp các gen IE thiết yếu đã bị loại trừ dạng in trans. Những vec tơ này không có khả năng sao chép trong các neuron vì đã mất các gen IE thiết yếu. (B) Amplicon sinh sôi nảy nở trong vi khuẩn nhờ việc sử dụng gốc sao chép của vi khuẩn (*E. coli ori*) và sau đó thâm chuyển vào dòng tế bào hỗ trợ bị thâm nhiễm với HSV trợ giúp khiếm khuyết. Plasmid amplicon sau đó sinh sôi nảy nở do có mặt gốc HSV (*HSV ori*) và tín hiệu đóng gói (trình tự 'a') và hợp nhất trong các hạt bao gồm các đoạn trùng lặp amplicon (khoảng 150 kb) hoặc hệ gen HSV khiếm khuyết. (C) Hệ thống amplicon không có virus trợ giúp không đòi hỏi virus trợ giúp khiếm khuyết hoặc dòng tế bào hỗ trợ cho plasmid amplicon đóng gói. Plasmid amplicon được thâm nhiễm vào các tế bào cùng với 5 cosmid có chứa các đoạn nối đầu nhau đại diện cho tất cả hệ gen HSV mã cho toàn bộ protein cần thiết cho việc sản xuất các hạt thâm nhiễm. Để đảm bảo chắc chắn là chỉ có plasmid amplicon mới được đóng gói chứ không phải là cosmid, người ta đã loại trừ các tín hiệu đóng gói (trình tự 'a') khỏi các dòng cosmid. (D) hệ thống lai HSV-AAV sử dụng hệ amplicon không có virus trợ giúp để đóng gói amplicon có chứa gen trị liệu đặt bên sườn bằng các các đoạn lặp tận cùng (ITR) của AAV để mã cho gen AAV rep, gen này có thể hợp nhất với gen trị liệu trong nhiễm sắc thể vật chủ khi rep được biểu hiện. (Hình vẽ ở trang sau)

(Theo M. Karina Soares, William F. Goins, Joseph C. Glorioso và David J. Fink. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

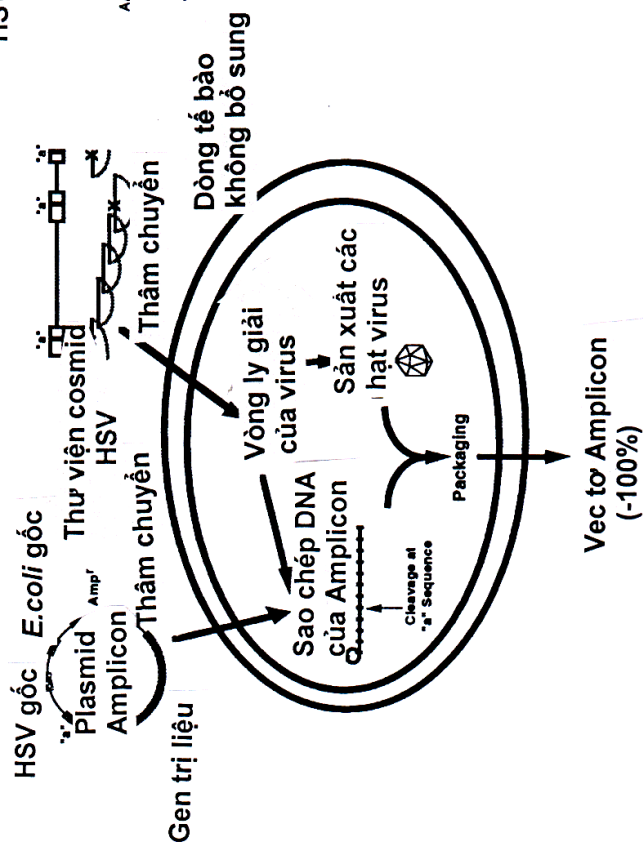
(A) Vec tơ HSV khiếm khuyết



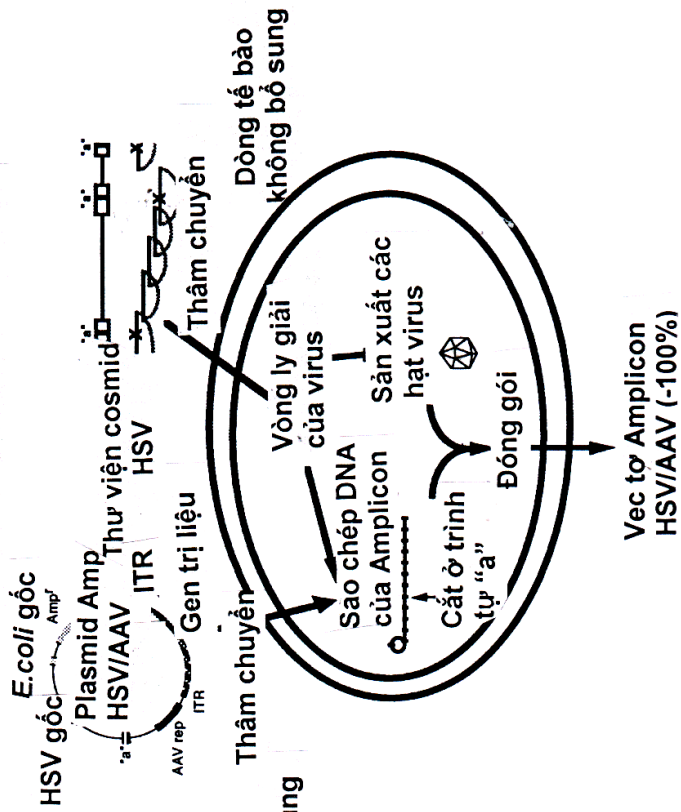
(B) Hệ Amplicon



(C) Hệ Amplicon không Virus trợ giúp



(D) Hệ lai HSV/AAV



Vec tơ an toàn nhất sẽ phải loại đi các gen IE của virus để hoạt hóa các chức năng sớm và muộn của virus *in vitro*. Những thể đột biến loại trừ nhiều phần gen sẽ không còn khả năng sao chép trong các neuron hoặc trong bất kỳ tế bào nào ngoài dòng hỗ trợ biến nạp ổn định. Những thể đột biến loại trừ chức năng IE của gen ICP4 và ICP27 thì ít độc hơn những thể đột biến chỉ loại trừ một gen đơn. Khi loại ICP22 khỏi virus ICP4⁻/ICP27⁻ thì làm giảm đáng kể độc tính của vec tơ hợp nhất. Những thể đột biến đã loại trừ các gen này thì có khả năng tải nạp một số tế bào nuôi cấy mô mà không gây chết tế bào, khi thâm nhiễm tăng 10 lần hoặc ít hơn một chút. Tuy nhiên, ICPO biểu hiện vượt trội về đột biến và có thể gây ảnh hưởng tới sự phát triển tế bào, sự sao chép của hệ gen và sự phân chia tế bào. Mặc dầu khi loại trừ ICPO, ICP4 và ICP27 có làm giảm độc tính và kéo dài đáng kể độ dài biểu hiện gen chuyển *in vitro*, nhưng mức độ biểu hiện gen lại giảm rất nhiều so với vec tơ chỉ thiếu ICP4, ICP22 và ICP27. Việc loại trừ cả một hệ thống gen này nhằm lập ra một bảng các vec tơ virus để chọn lọc trên cơ sở độ độc tế bào của virus và các sản phẩm kháng nguyên của virus cũng như sự biểu hiện gen chuyển tối thích *in vivo*. Tính kháng nguyên của các vec tơ hợp nhất là một vấn đề đối với vật chủ vì trí nhớ miễn dịch sẽ hoạt hóa các tế bào T hiệu ứng rồi chính những tế bào này sau đó sẽ loại trừ các tế bào có mang vec tơ. Cuối cùng là những vec tơ này không đủ khả năng thiết yếu để tái hoạt virus ra khỏi trạng thái tiềm tàng của chúng, vì thế mà các vec tơ này tương đối an toàn. Cũng cần phải nhấn mạnh rằng các vec tơ chuyển gen với xu hướng tự nhiên đối với hệ thần kinh cũng có thể áp dụng được đối với các mô khác.

8.3.3 Hệ thống promoter đối với sự biểu hiện gen chuyển

Tính trường tồn và mức độ biểu hiện gen đòi hỏi vec tơ chuyển gen phải phụ thuộc vào bản chất của ứng dụng trị liệu. Biểu hiện gen trị liệu mức thấp nhưng dài hạn phù hợp với việc điều trị những bệnh thoái hóa tiến triển và các bệnh mạn tính như Parkinson hoặc Alzheimer, còn khi biểu hiện với mức độ cao nhưng chỉ là những sản phẩm nhất thời của protein trị liệu lại thích hợp đối với việc điều trị các bệnh liên quan tới sự hủy hoại mô gốc khi gặp các sự cố thần kinh như đột quỵ hay khi bệnh đang lên cơn. Các promoter virus và tế bào đặc hiệu neuron được sử dụng để biểu hiện gen chuyển trong các quần thể đích và các hệ thống biểu hiện cảm ứng sẽ tác động tới thời gian của sự biểu hiện gen chuyển.

8.3.3.1 Sự biểu hiện tức thì

Nhiều promoter của các vec tơ HSV amplicon và vec tơ HSV có hệ gen thuộc thể hệ thứ nhất đã được sử dụng để biểu hiện gen trị liệu trong hệ thần kinh. Rất nhiều promoter vòng ly giải HSV như promoter ICPO và ICP4 của gen α (IE), promoter ICP6 của gen β (IE/E) β/β , promoter ICP8 và TK của gen γ (E), promoter gen δ (L) như gC đã được sử dụng trong các vec tơ hệ gen. Tuy nhiên, trong tất cả các trường hợp chúng chỉ còn hoạt tính khi thâm nhiễm cấp. Mặc dầu các promoter của gen α (IE) đã được sử dụng rộng rãi trong hệ thống amplicon để kéo dài sự biểu hiện của gen chuyển, nhưng hoạt tính này vẫn bị ảnh hưởng một cách tiềm ẩn bởi sự có mặt của virus trợ giúp trong chế phẩm amplicon hoặc trong tái tổ hợp giữa plasmid amplicon và hệ gen virus trợ giúp.

Các promoter từ các virus khác như SV40, virus JC, cytomegalovirus của người (human cytomegalovirus -HCMV) hoặc các đoạn lặp (ITR) của HIV, virus Rous sarcoma và virus

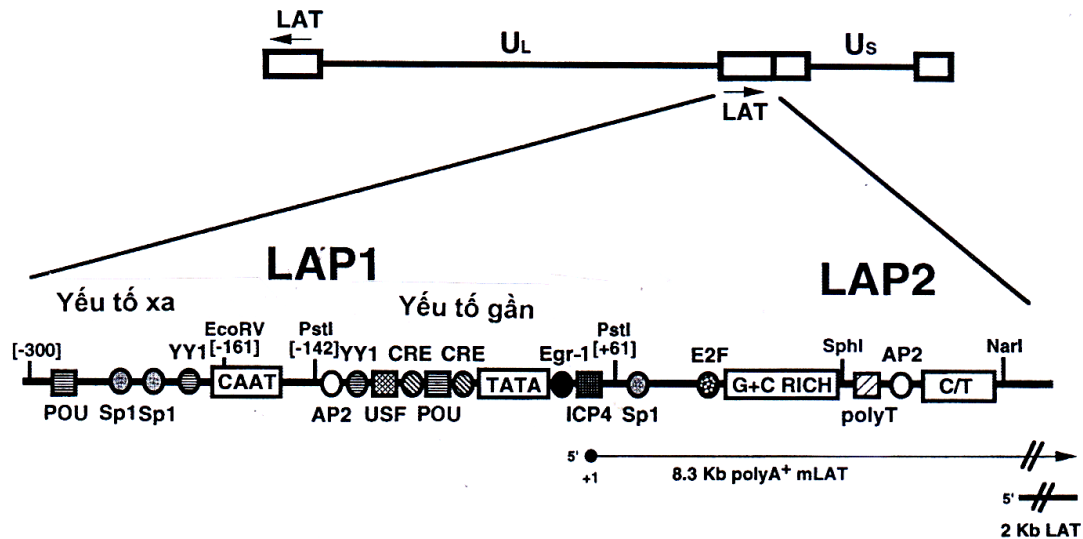
Moloney gây bệnh bạch cầu ở chuột (moloney murine leukemia virus – MoMLV) đã biểu hiện gen chuyển tức thời trong hệ thần kinh hoặc các mô khác trừ trường hợp LTR của MoMLV đặt kề với promoter hoạt tính tiềm tàng của HSV.

Các promoter tế bào như β globin hoặc albumin cũng như enolase đặc hiệu thần kinh (nerve-specific enolase- NSE), các tơ thần kinh (neuronfilament –NF) hoặc hypoxanthine phosphoribosyltransferase- HPRT), các promoter đặc hiệu thần kinh không biểu hiện được hoạt tính tế bào hoặc vẫn duy trì được hoạt tính nền trong vec tơ hệ gen HSV. Tuy nhiên, cả tyrosine hydroxylase (TH) hoặc các promoter đặc hiệu thần kinh proenkephalin đều thấy biểu hiện trong các vec tơ amplicon được sử dụng trong hệ TKTƯ và có tính đặc hiệu tế bào. Tất cả các promoter tế bào và promoter virus khi test từ các gen được phiên mã bởi các promoter của RNA polymerase II (RNAPII) và RNAPIII cho thấy đó là sự phiên mã tức thời từ các vec tơ hệ gen HSV, điều đó chứng tỏ rằng bản chất hoạt tính tức thời của promoter trong các vec tơ thể thứ nhất không phải dựa trên cơ sở của lớp RNA polymerase trong phức hợp phiên mã.

Sự biểu hiện của các promoter HSV ICP0 và HCMV IE thuộc vec tơ đột biến thể hệ thứ 3 đã loại trừ các gen IE (ICP4, ICP27 và ICP22) trong neuron nuôi cấy và trong hệ TKTƯ *in vitro* loài gặm nhấm kéo dài 6-8 tuần chứng minh rằng một trong số các sản phẩm gen IE đã được loại trừ trong vec tơ này đã làm giảm bớt sự biểu hiện gen của các vec tơ virus loại trừ IE đơn thể hệ thứ nhất. Các promoter đặc hiệu thần kinh có hoạt tính tức thời trong các vec tơ thiếu ICP4 thể hệ thứ nhất đã chứng minh rằng tính đặc hiệu thần kinh của các vec tơ loại trừ nhiều gen IE thuộc thể hệ thứ 3 có thể biểu hiện dài hạn như các vec tơ amplicon.

8.3.3.2 Sự biểu hiện dài hạn

Người ta đã chứng minh rằng trong vùng điều hòa hợp nhất tiềm tàng của HSV gốc thì chỉ có hệ thống promoter là giúp duy trì biểu hiện gen từ các vec tơ HSV-1 tái tổ hợp trong hệ thần kinh. Chức năng của các yếu tố tác động đặc hiệu *cis* đối với sự biểu hiện gen hợp nhất tiềm tàng đang được đánh giá nhằm xây dựng một promoter tối ưu trên cơ sở vùng điều hòa promoter LAT nguyên bản. Chúng ta hiểu rằng, sự biểu hiện gen đặc hiệu tiềm tàng phụ thuộc vào các trình tự trong hộp TATA 203 bp có LAP1 và vùng điều hòa ngược (Hình 8.4). LAP1 định vị ngay ở đầu 5' của LAT phụ 8,3 kb có hộp TATA, vị trí gần ICP4, hộp CAAT, vị trí gần U1 , 2 yếu tố CRE, vị trí Egr-1, Sp1 giả định, YY1 và các vị trí gần yếu tố POU cũng như yếu tố tăng cường ở vị trí khởi đầu sự phiên mã - cần cho sự phiên mã cơ bản *in vitro*. Khi ICP4 gắn vào vị trí khởi động phiên mã hoặc Egr-1 điều hòa xuống trực tiếp sự phiên mã hộp TATA thì sự phiên mã bị kìm hãm, có lẽ do hạn chế hình thành phức hợp tiền khởi đầu. Các nghiên cứu *in vitro* trong các tế bào PC12 chứng minh rằng promoter LAT được hoạt hóa thông qua con đường tải nạp tín hiệu Ras/Raf để đáp ứng với các yếu tố bên ngoài chẳng hạn như NGF và sodiumbutyrate. Các công trình trước đây cũng như hiện nay đều chứng minh rằng hộp TATA, USF1 và các vị trí CRE là cần thiết cho sự biểu hiện LAT *in vivo* và gần đây cũng cho thấy vị trí gần yếu tố POU giả định cũng đóng góp vào sự biểu hiện LAT *in vivo*.



Hình 8.4 Các yếu tố tác động cis trong LAP. Hai trình tự của promoter hoạt hóa tiềm tàng (latency active promoter- LAP) LAP1 và LAP2 được xác định là nằm ở phía trên của LAP. LAP1 có hộp TATA với các yếu tố kiểm soát trên như CAAT, USF1, CRE, Sp1, YY và các vị trí POU, vùng bắt đầu phiên mã nắm vai trò hoạt tính cơ bản của LAP1 và vị trí gần ICP4 điều hòa xuống sự biểu hiện của LAP cũng như một yếu tố tăng cường mạnh nằm phía dưới vị trí bắt đầu phiên mã. LAP2 là một promoter yếu hơn LAP1, nó thiếu hộp TATA nhưng lại có các yếu tố thường rất hay thay đổi của promoter gen nội trợ, một trình tự giàu GC và một trình tự giàu C/T tách biệt nhau bởi một trình tự 23 thymidin, tất cả chúng đều cần cho sự hoạt động của LAP2 trong các thử nghiệm biểu hiện gen tức thì.

(Theo M. Karina Soares, William F. Goins, Joseph C. Glorioso và David J. Fink. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

LAT cũng biểu hiện muộn trong vòng đời virus ly giải, chủ yếu do promoter thứ hai- LAP2 thúc đẩy LAP1 trong điều hòa biểu hiện LAT trong thời kỳ tiềm tàng. LAP2 định vị gần ngay intron LAT, có chứa một yếu tố khởi đầu tương hợp với yếu tố khởi đầu gen IVa2 của adenovirus ít TATA hơn hộp TATA các yếu tố điều hòa trong các promoter "nội trợ" (housekeeping), một yếu tố giàu C/T có trong các promoter ít TATA và một đoạn poly T gồm 23 thymidine thấy ở các trình tự điều hòa giả định của các gen tế bào nhân thực cao hơn. Cả thành phần C/T và đoạn poly T đều cần thiết cho sự hoạt động của LAP2 trong các thử nghiệm biểu hiện gen tức thì. Nhờ việc phân tích EMSA và vết chân (footprint) DNase người ta đã chứng minh rằng thành phần giàu C/T gắn với yếu tố phiên mã Sp1 và protein NSEP-1, thuộc họ các yếu tố gần promoter *c-myc* cũng như yếu tố EGF-R đã được chứng minh trước đây. Nhờ các thí nghiệm về độ nhạy cảm của S1 mà người ta đã vẽ được bản đồ vị trí nhạy cảm của S1 tại vùng nằm giữa thành phần poly T và trình tự giàu C/T của LAP2. Vị trí nhạy cảm S1 nuclease thường tương ứng với các vị trí nhạy cảm DNase I *in vivo*. Những vị trí nhạy cảm DNase I có những vùng 5' phiên mã tích cực và các vùng tăng cường (enhancer) phía trên và có thể chức năng phá vỡ cấu trúc chất nhiễm sắc là do sự loại trừ nucleosome. Người ta cũng chứng minh rằng nhờ liên kết của protein HMGI (Y) với đoạn poly T mà nó thúc đẩy sự chọn lọc và làm xáo trộn cấu trúc DNA cục bộ. Vùng giàu G + C của LAP2 có nhiều đảo nhỏ CpG, những đảo này có thể làm

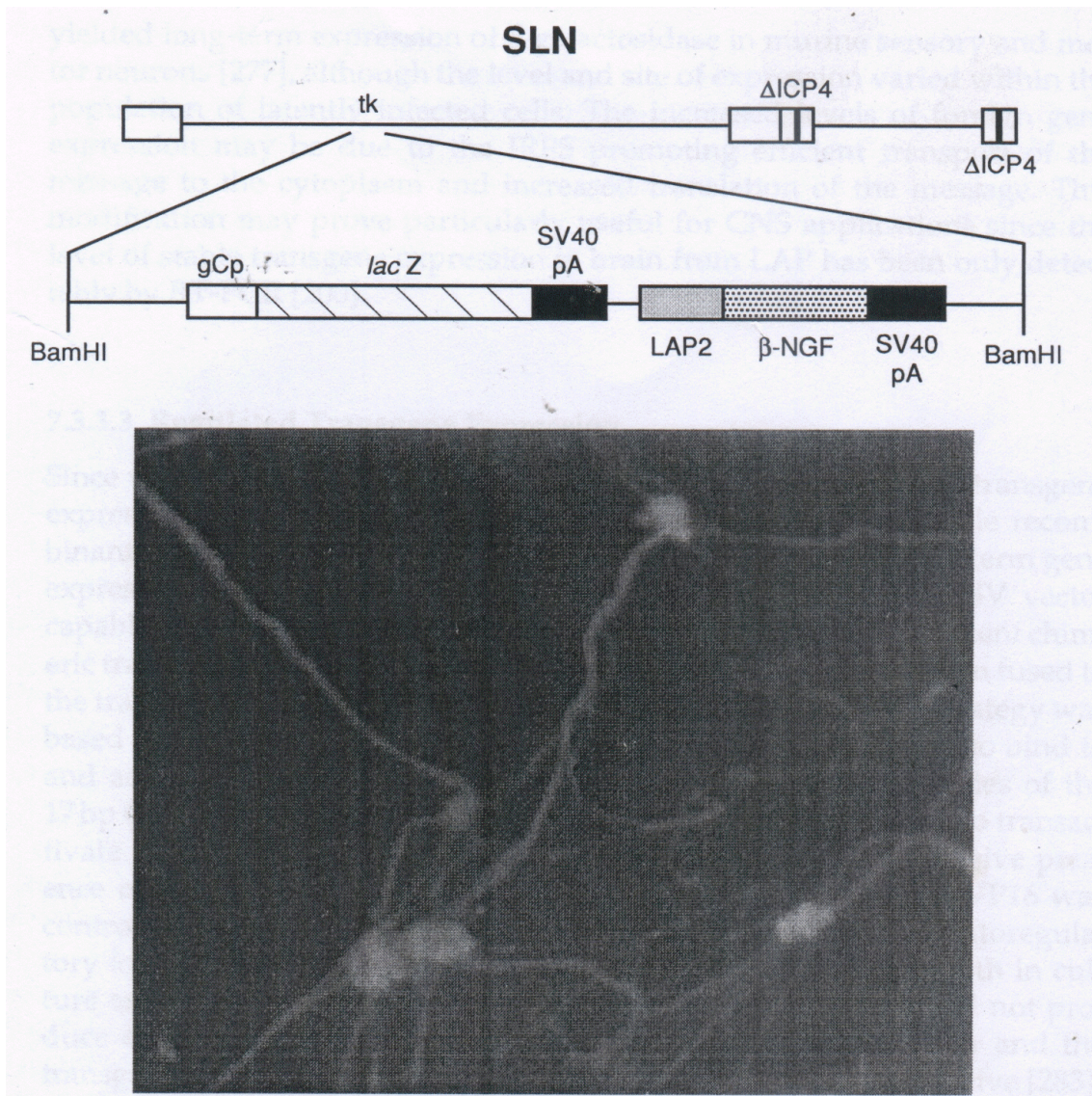
thay đổi sự methyl hóa cục bộ. Tuy nhiên, cơ chế này không phải là do hoạt tính của LAP vì hệ gen virus không được methyl hóa ở trạng thái tiềm tàng. Những đặc trưng này của LAP2 có thể góp phần vào việc loại trừ nucleosome hoặc hiệu ứng vị trí thúc đẩy sự biểu hiện gen trong hệ gen virus.

LAP1 khởi đầu được chứng minh là để giúp cho biểu hiện dài hạn β globin trong hệ thần kinh ngoại biên chuột từ một vec tơ mà cDNA của β globin đã được cài ngay dưới LAP1. Tất nhiên, sự biểu hiện này suy yếu dần theo thời gian. Tuy nhiên, một tái tổ hợp tương tự với cDNA của β - interferon (β -IFN) được cài vào cùng vị trí ngay dưới LAP1 lại không biểu hiện được β -IFN tiềm tàng, điều đó chứng minh rằng những trình tự trong intron thứ nhất của β globin có thể đáp ứng cho việc biểu hiện gen chuyển từ virus tái tổ hợp β globin ở trạng thái tiềm tàng. Một tái tổ hợp khác trong đó cDNA của β - glucuronidase được cài dưới LAP1 trong một virus đã loại bớt một phần LAP2 thì biểu hiện cao β -glucuronidase tức thì trong hạch thần kinh sọ chuột, còn ở thân não thì mức độ chuyển gen vẫn ở mức thấp. Tuy nhiên, cũng giống như tổ hợp β globin, mức độ biểu hiện gen chuyển và số neuron biểu hiện giảm đáng kể theo thời gian. Trong các nghiên cứu khác thì LAP1 không có khả năng duy trì biểu hiện gen chuyển từ locus glycoprotein C (GcC) hoặc ngay cả các locus LAT không có các trình tự LAP2 đặt dưới. Tuy nhiên, khi nối LTR của MoMLV với LAP1 đã bù đắp được sự thiếu hụt các trình tự dưới do đó mà biểu hiện gen chuyển dài hạn trong hệ thần kinh ngoại biên, điều đó chứng tỏ rằng LAP1 thiếu các yếu tố cần cho sự biểu hiện gen chuyển dài hạn nhưng lại có vị trí tác động *cis* cần cho sự biểu hiện đặc hiệu với hệ thần kinh. Sự biểu hiện β - galactosidase được kéo dài khi sử dụng các promoter LTR của MoMLV chứ không phải promoter sợi thần kinh (neurofilament promoter) khi hộp *lac Z* đã cài thêm vào phía trên 80 bp theo hướng đối diện với LAT. Điều đó có nghĩa là vùng LAP1 thúc đẩy sự biểu hiện đặc hiệu thần kinh khi được gắn với các yếu tố biểu hiện dài hạn CTR của MoMLV hoặc LAP2.

Khi cài gen chuyển vào ngay dưới LAP2 trong các locus LAT nguyên bản hay dưới LAP2 đơn trong vị trí lệch (ectopic) của Gc đã cho phép biểu hiện dài hạn cả trong hệ thần kinh ngoại biên (10 tháng) cũng như trong neuron hệ TKTƯ của chuột mặc dầu mức biểu hiện gen chuyển trong não giảm khi so sánh với những quan sát trên các neuron cảm giác của hệ thần kinh ngoại biên. Người ta đã chứng minh rằng LAP2 có khả năng biểu hiện dài hạn NGF trong dây thần kinh sọ và các neuron hạch gốc bó tiểu não (dorsal root ganglia neuron) (Hình 8.5) khi hộp biểu hiện gen có cả locus tk hoặc locus U_3 ectopic. Những kết quả này chứng tỏ rằng một yếu tố có trong LAP2 đáp ứng cho sự biểu hiện dài hạn qua trung gian ở trạng thái tiềm tàng và LTR của MoMLV có thể thay thế cho tác động đó. Mặc dầu LAP1 và LAP2 có thể có chức năng trong sự biểu hiện gen chuyển ở hệ TKTƯ, nhưng còn phải cải tiến hơn nữa để có được sự biểu hiện gen trị liệu ở mức sinh lý trên não.

Ngoài lực tác động của promoter LAT, mức độ và thời gian biểu hiện gen chuyển còn phụ thuộc vào sự phiên dịch mRNA và / hoặc tính ổn định của nó. Để làm tăng sự biểu hiện gen chuyển từ LAP, vị trí tiến vào ribosome (internal ribosome entry site -IRES) từ virus gây viêm não cơ tim (encephalomyocarditis) phải hòa vào cấu trúc gen nghiên cứu và được cài vào dưới LAP. Những tái tổ hợp này đã biểu hiện dài hạn β - galactosidase ở các neurom vận động và cảm giác của chuột, mặc dầu mức độ và vị trí biểu hiện có thay đổi trong quần thể các tế bào thâm nhiễm tiềm tàng. Mức độ tăng biểu hiện của gen ngoại lai có lẽ là do kích thích của IRES để vận chuyển hiệu quả thông tin tới tế bào chất và làm

tăng sự phiên dịch của bản tin. Sự cải tiến nâng cấp này rất thực dụng cho hệ TKTU vì biểu hiện gen chuyển từ LAP (chỉ có thể được bằng RT-PCR) ở não là ổn định.



Hình 8.5 Sự phát hiện bằng miễn dịch huỳnh quang của protein hoạt hóa miễn dịch β -NGF qua trung gian vec tơ hệ gen HSV không sao chép trong nuôi cấy DRG sơ cấp khi ở trạng thái tiềm tàng in vitro. Sản phẩm nuôi cấy neuron đã tách DRG sơ cấp được phân lập từ phôi chuột E16 sau 14 ngày thâm nhiễm (MOI = 10) với SLN (ICP4, tk:: LAP2-NGF), lớp tế bào đơn lớp được cố định bằng methanol và kiểm tra sự biểu hiện của β -NGF bằng miễn dịch huỳnh quang nhờ sử dụng một kháng thể đa dòng đặc hiệu cho protein và kháng thể thứ hai được đánh dấu FITC. Promoter LAP2 có hiệu ứng trong sự biểu hiện NGF trong trạng thái tiềm tàng sau thâm nhiễm 14 ngày.

(Theo M. Karina Soares, William F. Goins, Joseph C. Glorioso và David J. Fink. Gene Therapy Technologies, Applications and regulations. John Wiley & Sons Ltd 1999).

8.3.3.3 Điều hòa sự biểu hiện gen chuyển

Vì các vec tơ LAP không chuyển được gen tới não bộ với mức cao nên người ta phải sử dụng hệ thống hoạt chuyển chimeric tái tổ hợp cấu thành có thể cảm ứng được để điều hòa sự biểu hiện gen dài hạn trong Hệ TKTƯ. Trước hết người ta phải công nghệ hóa một vec tơ HSV có khả năng điều hòa sự biểu hiện gen chuyển bằng cách sử dụng một cấu trúc hoạt chuyển chimeric mạnh Gal4-VP16 của một domain gắn DNA-Gal4 nấm men hòa nhập với domain hoạt chuyển sản phẩm HSV VP16. Chiến lược này dựa trên cơ sở Gal4-VP16 chimeric mã hóa vec tơ HSV có thể gắn và hoạt hóa promoter chuyển gen có chứa 5 bản phiên mã cặp đôi yếu tố nhận biết Gal4 DNA 17 bp. Gal4-VP16 chứng minh rõ ràng là các promoter hoạt chuyển có vị trí này mặc dầu nó kiểm chế nucleosome. Hơn nữa, sự biểu hiện của Gal4-VP16 được kiểm soát bởi promoter nhạy cảm Gal nên hình thành nên một vòng điều hòa cấu trúc. Hệ thống này đã kích thích sự biểu hiện gen chuyển trong nuôi cấy cũng như ở não bộ. Tuy nhiên, vòng điều hòa tiềm tàng này không tạo được sự biểu hiện dài hạn cấu trúc đối với các chất hoạt chuyển cũng như gen chuyển trong hệ TKTƯ vì các promoter này chỉ tác động tức thì.

Vì vấn đề đích chuyển và sự điều hòa biểu hiện gen chuyển nên người ta đã cải tiến hệ thống này để đạt được mục tiêu là có thể cảm ứng được sự biểu hiện gen. Với cách tiếp cận này chất hoạt chuyển cấu trúc được thay thế bằng phân tử chimeric gồm một biến dạng domain gắn hormone của receptor progesterone hòa với chất hoạt chuyển cấu trúc. Domain gắn receptor biến dạng này không gắn được với progesterone nhưng lại gắn được với RU 468 tương tự như progesterone. Với sự có mặt của RU468 chất hoạt chuyển chimeric giữ cho cấu trúc có khả năng gắn và hoạt chuyển promoter nhạy cảm Gal4 mà trong hệ thống có thể cảm ứng được này sẽ biểu hiện được gen chuyển. Vì thế, khi vắng mặt RU486 thì gen chuyển sẽ nằm yên và sự biểu hiện có thể được hoạt hóa bằng cách cho thêm “thuốc” vào. Nhờ sử dụng hệ thống cảm ứng được mà người ta đạt được sự biểu hiện gen chuyển từ vec tơ virus ở mức cao trong não chuột khi đưa vào tĩnh mạch tác nhân cảm ứng RU486, điều đó chứng minh cho tính khả thi của hệ thống chuyển giao vec tơ virus cảm ứng thuốc. Hệ thống này có thể dùng để hoạt hóa đặc hiệu sự biểu hiện của các gen đơn cũng như các đa gen.

8.3.4 HSV amplicon

HSV amplicon thường được đề cập như các vec tơ HSV-1 khiếm khuyết, amplicon là các plasmid được công nghệ hóa có chứa cả gốc sao chép và tín hiệu đóng gói của HSV cũng như gốc sao chép của vi khuẩn. Các amplicon được sản sinh trong vi khuẩn sau đó cộng thâm chuyển với một thể đột biến virus trợ giúp HSV khiếm khuyết để tạo ra một quần thể hỗn hợp các hạt HSV có chứa hệ gen HSV trợ giúp khiếm khuyết hoặc những đoạn trùng lặp của plasmid đóng gói trong một capsid HSV (Hình 8.3B). Amplicon được dùng để biểu hiện các gen cần nghiên cứu hoặc các peptide có hoạt tính sinh học tức thì trong các hệ thống nuôi cấy mô, nhưng nếu có mặt các hạt virus trợ giúp thì có thể dẫn đến sự ngộ độc và làm chết tế bào và mất dần sự biểu hiện gen. *In vivo* người ta đã kéo dài

được sự biểu hiện của cả gen nghiên cứu *lacZ* và cả các sản phẩm gen trị liệu như tyrosine hydroxylase (TH), Bel-2, glucose transporter hoặc HSV-TK khi tiêm amplicon vào não. Trong các thí nghiệm này TH được biểu hiện từ các vec tơ amplicon trong thể vân thương tổn gây bởi 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Những động vật thương tổn được tiêm TH đã làm thay đổi vòng lưu chuyển của apomorphine. Tuy nhiên, chẳng có DNA vec tơ hay gen chuyển nào được phát hiện bằng những thay đổi về hành vi trong mô hình bệnh Parkinson ở động vật. Vì việc sản xuất amplicon đòi hỏi phải lặp đi lặp lại sự qua lại giữa amplicon/ virus trợ giúp nên có thể xảy ra sự hình thành virus hoang dã tái tổ hợp với tần số 10^{-5} , những chế phẩm amplicon/virus trợ giúp này đã làm chết 10% động vật thâm nhiễm trong các thí nghiệm *in vivo* và góp phần gây độc tính *in vitro* cũng như *in vivo* trong các chế phẩm amplicon tiêu chuẩn. Sự nhiễm bẩn bởi các tái tổ hợp virus đang sao chép đã làm phức tạp thêm cho việc giải thích các thí nghiệm này đặc biệt vì những lý do an toàn mà có thể dẫn tới việc cấy tiêm vào những vùng não có sự hủy hoại các tế bào neuron cục bộ.

Tại phòng thí nghiệm Geller người ta đã chứng minh rằng để sản xuất được chế phẩm amplicon thật sự không có virus trợ giúp (Hình 8.3C) phải sử dụng các cosmid có các đoạn giới hạn nối lên nhau của hệ gen virus không có các tín hiệu đóng gói. Tuy nhiên, với kết quả cao nhất đạt được (10^5 pfu/ml) nói chung vẫn thấp hơn độ chuẩn của các vec tơ khác và biểu hiện với giới hạn trung bình là 35 tế bào/ não bộ trong vòng 1 tháng sau khi tiêm chủng vào sọ. Theo những báo cáo gần đây thì sự biểu hiện của *LacZ* từ chế phẩm amplicon tiêu chuẩn là âm tính trong vòng 30 ngày tiêm chủng, ngược với các kết quả thông báo trước đó. Amplicon không có virus trợ giúp tồn tại được ở thể vân của chuột trong khi đó các chế phẩm tiêu chuẩn lại không được duy trì. Cũng tương tự như vậy, hạt amplicon này cũng có thể được cải tiến để tăng cường sự biểu hiện gen chuyển. Tuy nhiên, tính ổn định và khả năng tồn tại của DNA plasmid của amplicon trong nhân neuron và sự biểu hiện gen vẫn còn phải nghiên cứu bổ sung thêm.

8.3.5 Các vec tơ lai HSV-AAV mới

Các vec tơ lai HSV-AAV mới đã được công nghệ hóa (Hình 8.3D) duy trì sự biểu hiện gen trong các tế bào đang phân chia cũng như không phân chia đã tạo lợi thế về khả năng vận chuyển và tốc độ tải nạp của các vec tơ HSV tăng cao đồng thời cũng làm cho các vec tơ AAV có khả năng hợp nhất vào hệ gen vật chủ và kéo dài sự biểu hiện gen ở những tế bào đang phân chia. Sự thâm nhiễm của các tế bào burou não U87 người đang phân chia trong nuôi cấy với các vec tơ lai amplicon – AAV không có virus trợ giúp đã làm tăng thời gian biểu hiện gen so với amplicon không có virus trợ giúp. Sự có mặt sản phẩm gen *rep* của AAV đã làm tăng số tế bào tải nạp cũng như thời gian tồn tại của hệ gen vec tơ và kéo dài sự biểu hiện gen chuyển trong khi đó lại không có độc tính gây ra qua trung gian *rep*. Sự nâng cao này là do khuếch đại hay hợp nhất của hệ gen vec tơ thì vẫn còn phải nghiên cứu tiếp tục *in vivo* mới có lời giải đáp xác thực.

8.4 Tóm tắt chung và triển vọng của các vec tơ dùng trong hệ thần kinh

Virus herpes simplex có nhiều đặc trưng giúp nó trở thành một phương tiện vận chuyển gen cho hệ thần kinh một cách tiềm năng có thể sử dụng trong điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh u ở trung ương thần kinh (CNS) và các bệnh ở hệ thần kinh ngoại

biên. Virus này tồn tại lâu dài và lành tính trong các neuron của não và hệ thần kinh ngoại biên, tại đó hệ thống promoter đặc hiệu thần kinh của virus ở trạng thái tiềm tàng lại có chức năng biểu hiện dài hạn các gen tiềm năng của virus mà không bị nhận diện miễn dịch bởi các tế bào vật chủ. Các nhà khoa học hiện đang tập trung vào việc phát triển các vec tơ HSV bằng cách cải biến virus làm giảm độc tính của vec tơ hợp nhất và tìm hiểu kỹ hơn về các yếu tố điều hòa sự biểu hiện gen từ hệ gen virus tiềm tàng để tạo được các cấu trúc thích hợp, biểu hiện gen chuyển dài hạn hoặc có thể được điều hòa trong các neuron, hay sự biểu hiện tức thời v.v.. tất cả phụ thuộc vào chế độ trị liệu. Những vec tơ hiện tại có thể áp dụng trực tiếp để điều trị các bệnh của hệ thần kinh ngoại biên, người ta đã chứng minh rằng hệ gen của các vec tơ đó tồn tại được trong các neuron hệ thần kinh ngoại biên và biểu hiện ngắn hạn từ các promoter có cấu thành mạnh hoặc biểu hiện dài hạn từ hệ promoter virus tiềm tàng.

Khi virus đã tiềm tàng trong não thì hệ thống promoter tiềm ẩn sẽ được hoạt hóa kém hơn, khi đó nó đòi hỏi phải có những cải biến để nâng cao hoạt tính. Cũng có thể nâng cao hoạt tính của LAP thông qua việc cài vào các trình tự tác động *cis* đáp ứng các yếu tố phiên mã từ não liên quan với các dạng tế bào thần kinh khác. Thêm vào nữa là promoter tiềm tàng này có thể được sử dụng để biểu hiện các chất hoạt tải nhân tạo có khả năng điều chỉnh lên sự biểu hiện LAP thông qua liều lượng có tính chất cá thể với các thuốc có khả năng vượt qua hàng rào giữa não bộ và máu và hoạt hóa sự biểu hiện các sản phẩm gen trị liệu.

Những ứng dụng của vec tơ có khả năng sao chép cao điều trị ung thư sẽ đòi hỏi những nghiên cứu sâu hơn nữa. Cũng đã có những bằng chứng về hiệu ứng của virus tới các dạng tế bào đặc hiệu do việc thay thế những vùng đặc hiệu của glycoprotein lớp vỏ của HSV liên quan đến việc liên kết các receptor bề mặt tự nhiên của tế bào với các ligand liên kết mới. Vì vậy, có thể chứng minh được tính khả thi của virus với các đích đặc biệt như là các tế bào ung thư ở hệ TKTƯ nhờ việc loại bỏ liên kết của vec tơ với các neuron cận kề khác. Những đặc hiệu khác cũng có thể được cài vào bằng cách khai thác các promoter đặc hiệu tế bào khối u được hoạt hóa trong bộ khung vec tơ hệ gen đã loại bỏ nhiều gen IE và tăng độ an toàn đối với các vec tơ tự sát nhằm tiêu diệt bướu não do sự biểu hiện của chất hoạt hóa thuốc (HSV TK hoặc CD) chỉ xảy ra ở các tế bào khối u. Mặc dầu đã có những tiến bộ đáng kể trong việc thiết kế các vec tơ HSV để điều trị các bệnh của hệ thần kinh, nhưng hiện nay vẫn còn nhiều vec tơ đang được thử nghiệm trên mô hình động vật với các bệnh của người và tất nhiên sẽ còn nhiều công trình để cập tới việc ứng dụng trong hệ thần kinh trung ương (CNS) cũng như việc ứng dụng các virus để điều trị các bệnh thuộc các mô khác.

Phần thứ hai

GEN TRỊ LIỆU LÂM SÀNG

Chương IX

GEN TRỊ LIỆU BỆNH THIẾU HỤT MIỄN DỊCH TỔ HỢP TRẦM TRỌNG (SCID)

9.1 Mở đầu

Thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng (severe combined immunodeficiencies –SCID) là một nhóm bệnh di truyền đặc trưng bởi sự giảm sút mạnh hoặc mất hẳn chức năng của lympho T (Fisher, 1971). Do thiếu hụt cả miễn dịch thể dịch cũng như miễn dịch qua trung gian tế bào nên bệnh nhân thường bị chết rất sớm nếu không được cấy truyền tế bào gốc tạo máu. Trong hơn 30 năm qua những kỹ thuật cấy truyền đã có những tiến bộ đáng kể, tỷ lệ cứu sống các bệnh nhân SCID đạt trên 95% nếu người cho và nhận đều là anh chị em ruột (tránh được sự thải loại tổ chức ghép). Tuy nhiên trên thực tế cũng chỉ mới đạt được tỷ lệ 30% số mảnh ghép được chấp nhận với các bệnh nhân SCID vì các tế T đã loại thải các mảnh ghép đơn bội đồng nhất (haploidentical) nên tỷ lệ thành công của cấy ghép chỉ còn ở mức 50% (Fisher và cộng sự., 1990). Sự phức tạp này trước hết có liên quan tới độc tính do sự thâm nhiễm từ trước cũng như sự kiến tạo chậm trễ chức năng miễn dịch sau cấy ghép. Hiện nay người ta đang dùng kỹ thuật cấy ghép *in utero*. Hiệu lực và tính an toàn của cách tiếp cận này còn phải được so sánh với các phương pháp cấy ghép truyền thống và nó cũng bị giới hạn trong trường hợp những gia đình đã có những trẻ em đã bị tác động từ trước.

9.2 Bệnh lý phân tử của SCID

SCID là một nhóm bệnh di truyền dị gen, những tổn thương phân tử được trình bày ở bảng dưới đây:

Bảng 9.1 Những đặc điểm di truyền của SCID

Loại bệnh	Tế bào bị ảnh hưởng	Gen hoặc protein khiếm khuyết	Định vị trên NST
SCID liên quan tới 13,3	T, B(?), NK	ILc	Xq
NST giới tính X			
SCID liên quan NST	T, B(?), NK(?)	ADA	20q12-

13,1 thường		T, B(?), NK(?)	PNT
14q11,2			
	T(?)		CD3 ϵ /CD3 δ
11q23			
	T		ZAP70
2q12			
	T, NK	JAK-3	?
	T, B		AG1/RAG2
11p13			
Thiếu hụt MHC lớp II	T, B	RFX5	?
	T, B	RFXAP	?
	T, B	CIITA	?
Thiếu hụt MHC lớp I	T, B	TAP2	6p21,3

9.2.1 Thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng liên quan NST giới tính

Dạng SCID liên quan tới NST giới tính X (X-SCID) thường được phân biệt với các dạng khác bởi các đặc tính di truyền và người ta quan sát thấy những bé trai bị tác động thường vẫn có mức tế bào B ở mức bình thường (T-B+SCID) mặc dầu về bản chất thì phải là bất thường. X-SCID chiếm khoảng 50-60% tổng số các trường hợp SCID, nó gây nên bởi những khiếm khuyết gen chuỗi γ ở receptor interleukin-2 (IL-2R) (Leonard, 1994). IL-2R trước đây được xác định như một thành phần có ái lực cao và trung bình tạo nên ái lực gắn kết ligand và hòa nhập đầy đủ, chuỗi γ c (common gamma) biểu hiện cấu thành các tế bào lympho máu và hiện nay được hiểu như là một thành phần receptor bổ sung (IL-4R, IL-7R, IL-9R và IL-15R) (Leonard, 1994). Chuỗi γ c là một glycoprotein vận chuyển màng với các thiết kế đặc trưng của các thành viên họ receptor cytokine. Một nguyên lý cơ bản là mỗi chuỗi độc quyền của các receptor sẽ nhận diện một cytokine đặc hiệu và vì thế mà có sự đặc hiệu tín hiệu, trong khi đó chuỗi γ c biến nạp, tín hiệu lại thông qua domain tế bào chất của nó. Những receptor khác nhau có liên quan tới các giai đoạn sinh trưởng và sự chín của tế bào T (kể cả các tế bào NK) và tế bào B, cũng như phá vỡ sự biểu hiện của chúng do tăng thiếu hụt miễn dịch vì mất chức năng của IL-2R riêng rẽ.

9.2.2 Khiếm khuyết JAK-3

JAK-3 kinase có liên quan tới chuỗi γ c chứa các receptor cytokine nên nó trở thành một gen ứng cử viên của những đột biến T-B+SCID-JAK-3 mà ngày nay đã xác định được ở một số ít bệnh nhân T-B+SCID với kiểu hình miễn dịch giống như X-SCID, bao hàm cả sự phong tỏa biệt hóa tế bào NK (Macchi và cộng sự., 1995; Russell và cộng sự., 1995).

9.2.3 Thiếu hụt adenosine desaminase và purine nucleoside phosphorylase

Nhiều dạng thoái hóa NST thường của T-B-SCID gây nên bởi thiếu hụt adenosine deaminase (ADA) (15-25% tổng số các trường hợp SCID) và purine nucleoside phosphorylase – PNP (4% tổng số các trường hợp SCID) – một enzyme liên quan tới sự chuyển hóa purine.

9.2.4 Khiếm khuyết gen hoạt hóa tái tổ hợp (RAG1 và RAG2)

Dường như hơn một nửa số bệnh nhân T-B-SCID bị tác động bởi những đột biến ở gen RAG1 hoặc RAG2 (Schwarz và cộng sự., 1996). Những protein này có liên quan tới quá trình sắp xếp lại VDJ khi sản xuất các immunoglobulin và các receptor tế bào T (TCR). Kiểu hình của những bệnh nhân rất thay đổi, vắng mặt của các tế bào B và vắng mặt hay có với số lượng ít các tế bào T. Khi có sự hiện diện của các tế bào T thì đột biến sẽ ít nghiêm trọng hơn và lúc đó tạo nên kiểu hình hở (leaky phenotype).

9.2.5 Khiếm khuyết ZAP70

Đối với những đột biến ở ZAP70 thì protein tyrosine kinase có liên quan với TCR gắn với chuỗi ζ của phức hợp TCR-CD3, tạo nên một dạng SCID phân biệt (Perlmutter, 1994). Bệnh thoái hóa NST thường này hiếm và đặc trưng bởi sự vắng mặt của CD8+ và sự dày đặc các tế bào ngoại biên CD4+ (CD4+CD8-B+SCID), sự xuất hiện này là do phong tỏa intrathymic trội trong biệt hóa của các tế bào CD8+. Tuy nhiên, các tế bào CD4+T lại không tăng sinh sau khi được kích thích bởi TCR. Có thể nghĩ rằng do mất chức năng của protein ZAP70 nên đã làm mất khả năng gắn của TCR với các tín hiệu thấp hơn.

9.2.6 Thiếu hụt MHC lớp I (hội chứng lympho trần type I- type I bare lymphocyte syndrome)

Trường hợp anh chị em ruột có quan hệ huyết thống cũng đã được mô tả là có giảm mức phù hợp tổ chức chính lớp I trên bề mặt tế bào mặc dầu những phân tử này vẫn có mặt trong nội bào. Sự khiếm khuyết di truyền này gây nên bởi sự đột biến ở gen TAP2 – một thành phần của phức hợp vận chuyển peptide TAP có liên quan tới các quá trình của kháng nguyên (de La Salle và cộng sự., 1994).

9.2.7 Thiếu hụt miễn dịch MHC lớp II (hội chứng lympho trần type 2- type2 bare lymphocyte syndrome)

Thiếu hụt MHC lớp II là một dạng thoái hóa NST thường của SCID đặc trưng bởi sự có mặt của các tế bào T và B ở mức bình thường nhưng mất chức năng (T-B+SCID). Tất cả các tế bào từ tủy xương trong các cá thể bị tác động đều không biểu hiện kháng nguyên MHC lớp II (DR, DP và DQ).

Thiếu sự biểu hiện này là do không tổng hợp được các protein chuỗi α và β . Sự khiếm khuyết này không phải ở các gen của lớp II và cũng không định vị trong các locus MHC mà là do sự điều hòa biểu hiện các gen lớp II. Rõ ràng là có sự khiếm khuyết đặc biệt trong việc gắn kết của một phức hợp protein RFX để bảo tồn cao hộp X của promoter MHC lớp II trong một số bệnh nhân (Durand và cộng sự., 1997). Nhiều đột biến hiện nay đã phát hiện thấy ở một trong số các dưới đơn vị (subunit) của phức hợp này (RFX5) trong một nhóm bệnh nhân và thành phần thứ hai là (RFXAP) trong một nhóm bệnh nhân khác (Durand và cộng sự., 1997). Còn nhóm thứ 3 thì không thể hiện sự khiếm khuyết này và những đột biến lại được phát hiện ở một protein khác là CIITA -nó tác động như một chất hoạt chuyển MHC (Durand và cộng sự., 1997). Gen điều hòa mới này cần cho sự biểu hiện cấu trúc của tất cả các gen lớp II của MHC trong lympho B.

9.2.8 Những bất thường TCR-CD3

Hiếm khi thấy khiếm khuyết về chức năng và sự biểu hiện của phức hợp TCR-CD3 tế bào T là do đột biến các gen α và β của phức hợp CD3. Kiểu hình của bệnh này thay đổi từ bệnh SCID trầm trọng tới các triệu chứng hô hấp nhẹ hoặc hoàn toàn không có hiệu ứng.

9.3 Gen trị liệu đối với bệnh thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng (SCID)

Mặc dầu hiếm nhưng các bệnh thiếu hụt miễn dịch (THMD) sơ cấp có thể áp dụng theo nhiều kỹ thuật và đã trở thành một mô hình để thiết kế và test các quy trình gen trị liệu. Những tiến bộ về cơ sở phân tử một số bệnh như bệnh thiếu hụt adenosine deaminase (ADA-SCID), thiếu hụt chuỗi μ c (X-SCID), thiếu hụt JAK-3 kinase và thiếu hụt ZAP70 đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát triển các chiến lược trị liệu dựa trên cơ sở thao tác gen các tế bào soma (Blaese và cộng sự., 1995; Bordignon và cộng sự., 1995; Candotti và cộng sự., 1996; Kohn và cộng sự., 1995; Taylor và cộng sự., 1996). Việc trị liệu các trường hợp ADA-SCID đặc biệt phụ thuộc vào các nghiên cứu tiền lâm sàng và những thử nghiệm lâm sàng gần nhất.

9.3.1 Gen trị liệu lâm sàng đối với ADA-SCID

ADA-SCID là một bệnh do khiếm khuyết di truyền thứ hai của enzyme chuyển hóa purine (Hinschhorn, 1990). Hậu quả đầu tiên đối với con người là mất chức năng miễn dịch của lympho T và B. Mặc dầu vậy, qua chuột thiếu hụt ADA người ta đã xác định được vai trò đặc biệt của ADA trong quá trình phát triển thai (Migchielsen và cộng sự., 1995; Wakamiya và cộng sự., 1995). Điều thú vị là những chức năng gan của những bệnh nhân ADA-SCID có thể phục hồi lại được nếu được trị liệu thay thế enzyme (Bollinger và cộng sự., 1996). So với tất cả các mô thì hoạt tính cao nhất của enzyme ADA là ở các tế bào tuyến ức chưa chín và sự thiếu hụt ADA sẽ làm cho sự biệt hóa trong tuyến ức (intrathymic) bị suy giảm. Sự tích tụ của deoxyadenosine đi kèm với sự chuyển đổi thành chất độc deoxyadenosine triphosphate (dATP), đặc biệt trong các tế bào T. Những nghiên cứu về sinh hóa học đã chứng minh rằng sự tích tụ dATP sẽ dẫn đến ức chế enzyme ribonucleotide reductase (Cohen và cộng sự., 1983) - một enzyme chủ chốt trong tổng hợp deoxynucleotide và làm bất hoạt không thuận nghịch S-adenosylmethionine hydrolase (SAH), làm trung gian cho các quá trình methyl hóa quan trọng (Hershfield và Kredich, 1979). Mặc dầu sự biểu hiện của ADA ở khắp mọi nơi, nhưng chỉ các tế bào lympho là bị ảnh hưởng một cách đặc biệt vì nó bị nhiễm độc do sự tích tụ các chất chuyển hóa mà nguyên nhân có thể là do sự ức chế mạnh của các phân tử đặc hiệu tế bào T khi biệt hóa trong tuyến ức (Benvenist và cộng sự., 1995).

Trị liệu thay thế enzyme bằng ADA của bò cộng hợp với polyethylene glycol (PER-ADA) đã làm tăng đáng kể số lượng cũng như nâng cao chức năng các tế bào lympho trong nhiều bệnh nhân, nhưng có sự thay đổi về đáp ứng và ở đây có lẽ là đáp ứng tức thì (Hershfield, 1995; Hershfield và cộng sự., 1993). Điều đó phản ánh rằng tác động chính của PER-ADA là ở ngoài tế bào (bên trong tế bào chỉ thiếu hụt một phần thôi). Sự vắng mặt hoàn toàn ADA sẽ dẫn đến tử vong trước 20 tuổi. Tuy nhiên, chỉ cần duy trì hoạt tính 1-5% là bệnh đã thuyên giảm và đối với những người đã có hoạt tính dưới 10% thì coi

như đã ở mức bình thường (Hart và cộng sự., 1986; Hirshhorn, 1990; Morgan và cộng sự., 1987). Dĩ nhiên là mức ADA cao hơn bình thường tới 50 lần thì tính miễn dịch cũng vẫn là bình thường (Valentine và cộng sự., 1997). Những lưu ý này cần thiết cho việc thiết kế vec tơ.

Rõ ràng là hệ thống biểu hiện tương đối đơn giản như vậy có thể được áp dụng cho việc điều trị các loại bệnh này. Hơn nữa, sự chuyển ngược tự động tới mức bình thường *in vivo* của các thể đột biến di truyền (do hiện tượng khảm soma) cũng đã được mô tả gần đây (có sự thuyên giảm ở 2 bệnh nhân ADA-SCID và X-SCID). Điều đó chứng minh rằng những bệnh nhân đã được hiệu chỉnh đã có những lợi thế về sinh trưởng và biệt hóa phân biệt vượt trên các thể đột biến khác (Hirshhorn và cộng sự., 1996; Stephan và cộng sự., 1996).

9.3.2 Gen trị liệu lympho T đối với ADA-SCID

Tế bào đích thích hợp nhất cho gen trị liệu những bệnh thuộc về tạo máu là tế bào gốc tạo máu đa năng, vì thế ADA-SCID được đặc biệt quan tâm. Những thí nghiệm bước đầu đã chứng minh rằng việc kiến tạo lại sự tạo máu ở chuột với các tế bào tải nạp retrovirus đã thu được hiệu quả tương đối cao và có biểu hiện ADA người khi được truyền ghép lần 2 và lần 3, kể cả PHSC đã cải biến (Lim và cộng sự., 1989; Osborne và cộng sự., 1990; van Beusechen và cộng sự., 1990; Wilson và cộng sự., 1990). Một nhóm nghiên cứu cũng đã chứng minh sự thành công trong việc chuyển gen tới tủy xương khi rhesus và sự biểu hiện dài hạn ADA người và chuột *in vivo* mặc dầu với mức thấp [$< 3\%$] (Bodine và cộng sự., 1993; Kantoff và cộng sự., 1987; van Beusechen và cộng sự., 1993).

Thử nghiệm lâm sàng đầu tiên là tải nạp các tế bào tủy xương từ một bệnh nhân thiếu hụt ADA dưới sự chỉ đạo của Bordignon và đồng nghiệp ở Milan cùng với việc truyền lại cho bệnh nhân các tế bào lympho ngoại biên đã công nghệ hóa (Bordignon và cộng sự., 1995). Trong nghiên cứu này, 2 vec tơ retrovirus có thể được phân biệt với nhau bằng các kỹ thuật phân tử đã được sử dụng để chuyển một gen ADA nhỏ (mini) vào tủy xương hoặc vào các tế bào lympho của 2 bệnh nhân ADA-SCID để thay thế enzyme bằng gen ngoại sinh. Kiểm tra các tế bào đã biến đổi gen thì thấy số lượng tế bào lympho và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên cũng như sự tăng sinh đặc hiệu kháng nguyên và tác nhân gây phân bào đều thấy ở mức bình thường. Các thành phần của tế bào T (V β) cũng tiến triển bình thường. Thật ý nghĩa là sau một năm không điều trị tiếp tục, các tế bào T ngoại biên từ quần thể tải nạp đã được thay thế dần dần bởi các tế bào T từ tủy xương, điều đó chứng tỏ rằng sự tăng sinh đã có lợi thế. Tất cả những trẻ em có ghi trong danh sách này đều được điều trị thay thế enzyme mặc dầu liều lượng được giảm xuống tương đối thấp. Dĩ nhiên khi rút bỏ PEG-ADA sẽ hiện rõ hiệu lực thật sự của sự chuyển gen cũng như có thể kích thích được sự tăng sinh của các tế bào đã được hiệu chỉnh.

Trong một nghiên cứu biệt lập, các tế bào CD34+ thu nhận từ tủy xương của 3 bệnh nhân thiếu hụt ADA đã được sử dụng như đích của tải nạp bởi một vec tơ retrovirus mã cho cDNA của ADA người (Hoogerbrugge và cộng sự., 1996). Bằng PCR người ta đã phát hiện ra những tế bào đơn nhân và những tế bào hạt đã giữ lại hệ gen vec tơ trong tuần hoàn ngoại biên trên 3 tháng sau chuyển gen và một bệnh nhân giữ hệ gen vec tơ trong tủy xương tới 6 tháng. Tuy nhiên, sau thời gian trên thì không phát hiện được hệ gen vec tơ nữa. Có một bệnh nhân tới tận tháng thứ 3 sau cấy truyền vẫn không nhận được sự

thay thế enzyme, có lẽ vì hiệu lực chuyển gen thấp nên chưa đủ thời gian cho việc chỉnh lý lại gen các dòng tế bào.

9.3.3 Các yếu tố giới hạn gen trị liệu của tế bào gốc

Khả năng không hiệu quả trong tải nạp retrovirus của quần thể PHSC người là cao trong các nghiên cứu lâm sàng khi sử dụng các gen dấu chuẩn. Trong mô hình bức xạ mạnh trên động vật, 30-405 tế bào ghép dài hạn có thể tải nạp ổn định *ex vivo* nhờ các vec tơ retrovirus thế hệ hiện đại (Karlsson, 1991; Miller và cộng sự., 1994; William, 1990). Tuy nhiên, khi chuyển kỹ thuật này sang người hay những động vật cao cấp không phải người hoặc những động vật lớn lai xa khác thì sự thành công sẽ ít hơn (Bodine và cộng sự., 1993; Kantoff và cộng sự., 1987; Kiem và cộng sự., 1994; van Beusechem và cộng sự., 1993). Trong các nghiên cứu trên lâm sàng, dưới 1% số tế bào ngoại biên rõ ràng biểu hiện dài hạn với các vec tơ retrovirus (Brenner và cộng sự., 1993; Dunbar và cộng sự., 1995). Lý do của sự trái ngược này chưa rõ, nhưng có thể là do phản ánh chưa đầy đủ những hiểu biết về điều kiện nuôi cấy cần thiết để duy trì sự toàn vẹn cũng như chức năng của PHSC, sự bất lực của các vec tơ retrovirus chuột thế hệ đương thời đối với sự tải nạp các tế bào tiềm tàng (Abkowitz và cộng sự., 1995). Những tế bào thu lượm được từ máu dây rốn có thể là các đích tốt hơn đối với sự chuyển gen qua trung gian retrovirus, vì thế mà nó đang được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng đối với ADA-SCID. Trong nghiên cứu này 3 trẻ em được chẩn đoán trước sinh đã được truyền tải nạp các tế bào CD34+ của máu dây rốn - ở thời điểm mà chúng bắt đầu được trị liệu thay thế enzyme. 18 tháng sau khi được cấy ghép, một số tế bào lympho vẫn duy trì sự chuyển gen và thấy hoạt tính của ADA ở các tế bào không chọn lọc là cực kỳ thấp (Kohn và cộng sự., 1995). Nếu loại bỏ dần dần PEG-ADA thì sẽ tạo thuận lợi cho sự tăng sinh của các tế bào đã được hiệu chỉnh gen.

Sự trái ngược giữa các kết quả thu được từ các nghiên cứu trên lâm sàng và tiền lâm sàng có thể một phần do các công cụ đặc biệt cần cho các động vật tiếp nhận. Có thể hiểu rằng sự kiến tạo lại các tế bào đã được hiệu chỉnh gen có thể được tăng cường bằng cách kiểm soát “không gian-space” các mảnh ghép, tuy nhiên sự mạo hiểm đối với các quy trình áp dụng cho SCID có thể tăng lên gấp đôi.

9.4 Cải tiến các hệ thống vec tơ

Virus adeno liên hợp (AAV) là một parvovirus không gây bệnh trên người vì thế nó hấp dẫn như một vec tơ vận chuyển gen (Kotin, 1994). Sự sao chép của các virus này thường phụ thuộc vào một virus herpes trợ giúp đồng nhiễm. Khi không có virus trợ giúp (thường là adenovirus) thì hệ gen AAV thể hoang dã có thể hợp nhất ổn định với hệ gen tế bào vật chủ bởi sự tái tổ hợp không tương đồng theo hướng đầu-đuôi (Kotin và cộng sự., 1992; Samulskivà cộng sự., 1991). Khi phân tích các trình tự bên của các tế bào đã bị nhiễm nhưng vẫn ở trạng thái tiềm tàng cho thấy sự hợp nhất xảy ra ở nhiều vị trí trong locus đơn đặc hiệu AAV-S1 và 60-70% các trường hợp là 19q13,3-qter trong bản đồ nhiễm sắc thể của người. Các vec tơ AAV trong đó gen *rep* được loại đi có thể hợp nhất một cách ngẫu nhiên, điều đó chứng tỏ rằng các sản phẩm gen *rep* (Rep78 và Rep68) là rất quan trọng đối với quá trình này.

Các vec tơ cơ sở AAV đã sử dụng thành công trong tải nạp các tế bào đang phân chia *in vitro* và các tế bào không phân chia *in vivo* (Ali và cộng sự., 1996; Fisher và cộng sự., 1997; Kaplitt và cộng sự., 1994; Kessler và cộng sự., 1996; Thrasher và cộng sự., 1995; Xiao và cộng sự., 1996). Hiệu ứng tải nạp đối với nguyên bào sợi người sơ cấp nuôi cấy ở pha S cao hơn 200 lần các tế bào nghỉ, mặc dầu trong những thí nghiệm này hệ gen vec tơ vẫn còn tồn tại ít nhất 20 ngày trong nuôi cấy và có thể được tuyển mộ để tải nạp ở bất kỳ thời điểm nào (Russell và cộng sự., 1994). Đặc tính này rất hữu ích cho việc tải nạp các quần thể tế bào phân chia chậm như PHSC. Tuy nhiên, việc sản xuất AAV tái tổ hợp vẫn còn nhiều khó khăn và một vài dạng tế bào trong đó có các tế bào tổ tiên CD34+ tạo máu có thể là tương đối khó có sự tải nạp ổn định (Goodman và cộng sự., 1994; Malik và cộng sự., 1997; Walsh và cộng sự., 1994; Zhou và cộng sự., 1994). Mặc dầu bản chất của các vec tơ tế bào của AAV vẫn chưa được rõ, nhưng vấn đề cần sáng tỏ là khả năng của tế bào trong việc chuyển đổi hệ gen rAAV chuỗi đơn mới được nhập vào thành dạng chuỗi kép phiên mã tích cực. Quá trình này gần đây đã được chỉ rõ là được kích thích bởi ORF6 của adenovirus E4 (Ferrari và cộng sự., 1996; Fisher và cộng sự., 1996), và các virus trợ giúp (Thrasher). Mặc dầu các quá trình tế bào vẫn chưa được sáng tỏ, nhưng có lẽ các tác nhân gen gây độc và các stress sinh lý có thể đóng vai trò trợ giúp, điều đó chứng minh vai trò quan trọng của cơ chế sửa chữa (Alexander và cộng sự., 1994; D. Russell và cộng sự., 1995). Vấn đề là hiệu lực của tải nạp PHSC liệu có thể được tăng cường bởi một cơ chế tương tự như thế hay không thì vẫn chưa rõ.

9.5 Đánh giá tiền lâm sàng sự chuyển gen tế bào gốc của sự tạo máu

Một khó khăn trong việc đánh giá tiền lâm sàng của kỹ thuật chuyển gen là khả năng test về hoạt tính phục hồi quần thể của PHSC người. Những tế bào tổ tiên của sự tạo máu nguyên thủy có thể định lượng *in vitro* trong nuôi cấy tủy dài hạn, được phát hiện bởi những tế bào tạo sỏi (cobblestone area forming cells – AFC) hoặc bởi những tế bào gen tách dòng (clonogenic cells) trong các thí nghiệm nuôi cấy dài hạn tế bào khởi đầu (long-term culture initiating cell assay – LTC-IC). Tuy nhiên, những tế bào này là đại diện cho quần thể di gen và không có hoạt tính của PHSC. Một thử nghiệm với nhiều thông tin hơn và có thể test được khả năng phục hồi quần thể dựa trên sự cấy ghép các tế bào tạo máu tổ tiên của người vào chuột thiếu hụt miễn dịch *bg/nu/scid* (Nolta và cộng sự., 1994), hoặc chuột *scid/scid* (đột biến trong tiểu đơn vị xúc tác của DNA protein kinase gây sự tạo máu của SCID chimeric ở người (chimeric SCID- human –SCID-hu) (Dick và cộng sự., 1991; Shultz và cộng sự., 1995). Những nghiên cứu này đã chứng minh rằng chính những tế bào người nguyên thủy đã được ghép vào chuột và sự có mặt của cytokine người đã làm tăng sinh và biệt hóa trong đa tủy xương và những dòng hồng cầu và tế bào B đã duy trì được ít nhất 4 tháng. Gần đây hơn, chuột NOD/LtSz – *scid/scid* (NOD/SCID) (được tạo ra bằng cách lai ngược thể đột biến *scid* thành dòng NOD/LtSz-diabetic) đã được chứng minh là có thể được cấy ghép rất tốt mà không cần tới các cytokine ngoại sinh, vì thế đã tạo được hệ thống thực nghiệm có thể đánh giá được các tế bào tạo máu tổ tiên nguyên thủy của người và test được hiệu ứng sự vận chuyển gen của những tế bào này. Nhưng thực tế thì nhiều LTC-IC đã được tải nạp lại không có khả năng cấy ghép dài hạn cho chuột SCID (Larochelle và cộng sự., 1996). Điều này càng củng cố thêm sự lưu tâm rằng những tế bào khôi phục quần thể SCID (SCID repopulating cells – SRC) có sự phân biệt về sinh học và là đại diện gần hơn cho các tế bào phục hồi

quần thể dài hạn của người, mặc dầu mối quan hệ chuẩn xác giữa SRC và PHSC thì vẫn chưa rõ.

Chương X

ĐIỀU TRỊ BỆNH XƠ NANG

10.1 Mở đầu

Bệnh xơ nang (cystic fibrosis-CF) từ lâu đã là ứng cử viên của điều trị bằng gen. Sở dĩ như vậy vì: (1) các đặc trưng di truyền của bệnh này đã được nghiên cứu kỹ càng, (2) CF chỉ cần điều trị ngắn hạn, (3) chỉ có phổi là cơ quan chính bị bệnh này, (4) sự chuyển gen chưa đạt 100% vẫn thúc đẩy các quá trình của bệnh. Việc xác định và tách dòng các gen gây bệnh CF đã được thực hiện năm 1989 và người ta đã nhanh chóng đi đến các nghiên cứu lâm sàng để kiểm tra tính khả thi của gen trị liệu đối với bệnh xơ nang. Trong chương này chúng tôi sẽ trình bày về cơ chế bệnh lý của CF cũng như hiện trạng của gen trị liệu đối với bệnh xơ nang.

10.2 Đặc trưng di truyền của bệnh xơ nang

CF là một bệnh gây bởi một gen đơn do sự thoái hóa NST thường. Trong quần thể ở Caucase, cứ 20 người thì có một người mang gen bệnh và 1/2000 sơ sinh bị bệnh CF. Gen tác động nằm ở cánh tay dài của NST số 7 có tên là gen điều hòa vận chuyển màng xơ nang (cystic fibrosis transmembrane regulator -CFTR) (Rommens và cộng sự., 1989).

Trình tự hệ gen vào khoảng 250 kb, chứa 27 exon và mã cho một mRNA khoảng 6,5 kb (Rommens và cộng sự., 1989; Zielenski và cộng sự., 1991). Đột biến phổ biến nhất với CF là loại bỏ 3 cặp base ở exon 10 ($\Delta F508$) chiếm khoảng 70% số NST của CF (Kerem và cộng sự., 1989). Có tất cả khoảng 400 đột biến có liên quan tới CF đã được xác định (Tsui., 1992).

10.3 Protein CFTR và bệnh học của bệnh xơ nang (CF)

Gen CFTR mã cho một protein có 2 vùng vận chuyển màng, 2 domain gắn nucleotide và một vùng điều hòa có nhiều vị trí phosphoryl hóa tiềm tàng (Riordan và cộng sự., 1989). Protein CFTR là một kênh chloride được điều hòa bởi cAMP (Anderson và cộng sự., 1991; Welsh và cộng sự., 1992) có ở mặt ngoài cùng của các tế bào biểu mô của đường dẫn khí, ruột, tụy, gan, tuyến mồ hôi và mạch tinh quản ở phụ nữ (Cohn, 1994). Những đột biến ở CFTR có thể được phân loại theo hiệu ứng của chúng trong việc sản xuất cũng như chức năng của CFTR. Đa số những đột biến đều dẫn đến dừng sản xuất toàn bộ protein, cũng giống như đột biến $\Delta F508$, nó tạo điều kiện cho việc sản xuất ra một protein bất hoạt, không tới được bề mặt tế bào và như vậy làm giảm đáng kể sự tiết chloride. Hai lớp đột biến khác làm cho các kênh không bình thường tức là vẫn tiết chloride nhưng không được điều hòa hoặc giảm về mức độ (Welsh và Smith, 1993).

Mối liên quan giữa các đột biến ở gen CFTR và mất chức năng tiết chloride cũng như bệnh lý học của CFTR vẫn chưa rõ ràng và còn nhiều tranh luận. Một thuyết cho rằng ở điều kiện tiêu chuẩn, sự tiết chloride trên bề mặt niêm mạc thông qua CFTR sẽ cho phép nước đi qua nhờ thẩm thấu. Sự di chuyển của nước đã duy trì sự hydrate hóa bề mặt tế bào biểu mô và các dịch tiết. Ở đường tiêu hóa do sự hydrate hóa của ruột đã làm cho 10% bệnh nhân CF bị tắc ruột và làm nút lại các ống dẫn ở tụy dẫn đến teo tụy ở 80-90% số bệnh nhân. Ở phổi do gián đoạn di chuyển nước nên cũng có thể là nguyên nhân gây cản trở việc làm sạch các chất nhầy của niêm mạc (mucociliary clearance -MCC), quá trình này đảm bảo cho việc loại thải các hạt bụi và vi khuẩn đã hít vào với sự hoạt động đồng bộ của lông rung. Khi các chất nhầy dầy lên và sự làm sạch các chất nhầy niêm mạc kém hiệu quả thì phổi trở thành nơi thâm nhập thường xuyên của các vi khuẩn. Sự thâm nhiễm có định kỳ với các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus Pseudomonas aeruginosa* và *Burkholderia cepacia* cũng góp phần quan trọng tới các chu kỳ viêm nhiễm dẫn đến giãn phế quản và khó thở cho các bệnh nhân CF. Một yếu tố khác là sự hấp thụ natrium bất thường ở các bệnh nhân CF, thường tăng lên 2-3 lần (Knowles và cộng sự., 1981). Tuy nhiên, vì nước lại cho natrium dịch chuyển, nên sự bất thường thứ hai này sẽ dẫn đến sự dehydrate của các chất dịch biểu mô và vì thế làm cho chất nhầy dầy lên và làm giảm sự làm sạch các chất nhầy niêm mạc.

Gần đây hơn một vài nghiên cứu đã được bắt đầu để chứng minh rằng có thể có một đường dây liên hệ trực tiếp hơn giữa CFTR và sự kết dính và /hoặc sự tạo quần thể vi khuẩn ở đường dẫn khí của các bệnh nhân CF. Một công trình nghiên cứu đã chứng minh rằng khi chuyển cDNA của CFTR người tới các tế bào mũi của CF sơ cấp đã làm giảm đáng kể số gắn kết của *P. aeruginosa* nếu so sánh với CF không được thâm chuyển hoặc thâm chuyển kém (Davies và cộng sự., 1997). Một nghiên cứu khác đã chứng minh rằng chất dịch trên bề mặt đường dẫn khí bình thường vẫn có vi khuẩn hoạt động. Tuy nhiên, các chất dịch ở đường dẫn khí của bệnh nhân CF thì không có khả năng cảm ứng giết *P.aeruginosa* hoặc *S. aureus*. Khi chuyển cDNA của CFTR tới các tế bào CF nó sẽ chỉnh lý lại

sự khiếm khuyết trong việc diệt khuẩn, biểu mô của CF làm hạ thấp được nồng độ muối. Điều đó chứng minh rằng sự tắc nghẽn vận chuyển chloride và natrium có ảnh hưởng trực tiếp tới sự hoạt động của vi khuẩn (Smith và cộng sự., 1996). Gần đây người ta đã chứng minh được rằng các kháng sinh tự nhiên (defensins) được sản sinh trong các đường dẫn khí rất nhạy cảm với muối và vì thế bị bất hoạt ở đường dẫn khí của các bệnh nhân CF. Một defensin khác là α -defensin-1 có hoạt tính kháng vi khuẩn phụ thuộc muối kháng lại được *P. aeruginosa* (Goldman và cộng sự., 1997). Tuy nhiên, hầu hết các thí nghiệm này mới được thực hiện *in vitro* hoặc *ex vivo*. Những phân tích gần đây về các thành phần ion có trong dịch bề mặt đường dẫn khí lấy mẫu từ *in vivo* đã chứng minh không thấy có sự khác biệt giữa các đối tượng bình thường và những bệnh nhân xơ nang.

10.4 Điều trị bệnh xơ nang

Những phương pháp điều trị bệnh xơ nang hiện nay đều hướng vào việc loại trừ các triệu chứng và làm chậm sự tiến triển của bệnh. Trị liệu thường gặp nhất là bổ sung enzyme và chế độ ăn để xử lý mất chức năng của tụy. Điều trị sinh lý, kháng sinh và kháng viêm để kiểm soát sự tiến triển của bệnh ở đường dẫn khí. Mặc dầu đã có nhiều nghiên cứu đương thời nhằm điều chỉnh các khiếm khuyết về điện sinh lý của CF bằng cách làm thay đổi các con đường liên quan tới natrium hoặc chloride nhưng cũng chỉ thu được chút ít tiến bộ trong vài năm qua, vì thế chuyển gen là một cách tiếp cận rất khả thi đối với bệnh xơ nang.

10.5 Hệ thống chuyển gen và bệnh xơ nang

10.5.1 Cơ sở lý luận

Tuy CF là một bệnh do đa gen, nhưng về khía cạnh hô hấp thì lại là loại bệnh bị mắc nhiều nhất và số người chết vì bệnh này cũng nhiều nhất, vì thế đường dẫn khí là đích chính của gen trị liệu. Điều đáng quan tâm trong việc phát triển chiến lược gen trị liệu (GTL) với CF là phải thiết lập được một mức chuyển gen thấp nhất mà vẫn cải thiện được sự tiến triển của bệnh. CF là một kiểu hình bình thường và vì vậy người ta đã chứng minh được rằng chỉ cần biểu hiện được 50% mức bình thường của CFTR là đủ để phòng được bệnh này. Điều thú vị là cả *in vitro* và *in vivo* đều chứng minh rằng ngay cả khi biểu hiện được một ít gen này cũng đã đủ làm bình thường sự tiết chloride. Nếu tự tải nạp được 5%-20% tế bào CF thì sẽ hoàn trả được độ dẫn điện của chloride (Goldman và cộng sự., 1995; Johnson và cộng sự., 1992; Zabner và cộng sự., 1994) và ở chuột chuyển gen CF thì chỉ cần biểu hiện được 5% mức bình thường của *Cftr* đã thấy sự tiết chloride ở mức rất khác (xấp xỉ khoảng 50% dạng hoang dã) (Dorin và cộng sự., 1996). Tuy nhiên, cũng cần phải nhấn mạnh rằng vẫn chưa rõ là những phát hiện này có liên quan thế nào với các lợi ích lâm sàng mặc dầu trong chuột chuyển gen chỉ cần biểu hiện được 5% dạng *Cftr* hoang dã là đã làm giảm đáng kể các bệnh đường ruột (Dorin và cộng sự., 1996). Cũng cần phải lưu ý rằng việc hiệu chỉnh cường độ hấp thụ natrium thì đòi hỏi phải có mức chuyển gen cao hơn nhiều, có lẽ phải tới 100% (Goldman và cộng sự., 1995).

Ngược lại, sự biểu hiện CFTR quá mức ở những vị trí không bình thường thì mới chỉ có rất ít công trình nghiên cứu đề cập tới. Tuy nhiên, những dẫn liệu từ những nghiên cứu này đã làm khích lệ các nhà khoa học rất nhiều. *In vitro*, Rosenfeld và cộng sự đã chứng minh

rằng khi làm tăng mức protein CFTR cũng không gây cảm ứng mức cAMP để tiết chloride vượt quá mức xác định (Rosenfeld và cộng sự., 1994) và *in vivo*, chuột chuyển gen biểu hiện cả CFTR người và chuột thì vẫn không có hiệu ứng đối với sự phát triển khối lượng, hình thái học của phổi cũng như sự phát triển chung (Whitsett và cộng sự., 1992). Hầu hết các hệ thống chuyển gen hiện nay đều chuyển DNA của CFTR qua trung gian và đã thu được những kết quả đáng kể. Tuy nhiên ở đây chỉ đề cập các vấn đề sinh học của hệ thống chuyển gen trong GTL bệnh CF, còn những chi tiết khác về khoa học cơ bản và các vec tơ virus của mỗi hệ thống thì đã được đề cập ở các chương trước.

10.5.2 Chuyển gen qua trung gian retrovirus

Báo cáo đầu tiên *in vitro* về việc hiệu chỉnh sự khiếm khuyết kênh chloride của CF là việc chuyển giao qua trung gian retrovirus cDNA của CFTR tới các dòng tế bào CF (Drumm và cộng sự., 1990; Rich và cộng sự., 1990). Khi nuôi cấy sơ cấp các tế bào biểu mô tiết và đáy đường dẫn khí, kể cả các tế bào tổ tiên cũng có thể được tải nạp bởi các vec tơ retrovirus (Halbert và cộng sự., 1996). Tuy nhiên, *in vivo* các retrovirus lại không thích hợp là trung gian cho sự chuyển gen tới đường dẫn khí. Sở dĩ như vậy là do các retrovirus type C của động vật có vú đòi hỏi phải có sự tăng sinh tế bào cho sự hợp nhất của provirus và sự biểu hiện của gen hơn nữa chúng ta cũng biết rằng các tế bào biểu mô trên bề mặt các đường dẫn khí lại là loại tế bào đã biệt hóa tận cùng vì thế sự phân chia xảy ra rất chậm thậm chí không còn khả năng phân chia nữa. Giả thuyết này có giá trị phần nào bởi vì người ta quan sát thấy rằng sự chuyển gen qua trung gian retrovirus có thể cảm ứng được qua *in vivo* các tế bào đường dẫn khí nhưng chỉ ở những biểu mô bị hủy hoại - ở đó chúng sẽ được kích thích tăng sinh và cho phép thúc đẩy các tế bào tổ tiên tăng sinh nhanh hơn (Halbert và cộng sự., 1996). Tuy nhiên, những tế bào ở biểu mô và các đường dẫn tuyến dưới niêm mạc người lại không được phân chia (Leigh và cộng sự., 1995). Đặc biệt nghiên cứu này đã chỉ ra rằng biểu mô đường dẫn khí bị hủy hoại của những bệnh nhân CF đã được kích thích tăng sinh, điều đó có nghĩa là *in vivo* việc chuyển DNA qua trung gian retrovirus tới đường dẫn khí vẫn còn là khả thi. Cuối cùng là, sự biến đổi các vec tơ retrovirus trên cơ sở virus gây bệnh bạch cầu chuột Moloney type C của động vật có vú tiêu chuẩn (Moloney murine leukemia virus- MoMLV) đã tạo được lợi thế đối với các tế bào không phân chia. Những vec tơ này dựa trên cơ sở HIV-1 lentivirus của người (Naldini và cộng sự., 1996). Goldman và cộng sự cũng chỉ rõ rằng các vec tơ giả HIV tải nạp được *in vitro* những tế bào biểu mô đường dẫn khí của người không phân chia được, ở đó không có các retyrovirus MoMLV (Goldman và cộng sự., 1997). Mặc dầu vậy, các vec tơ HIV biểu hiện CFTR cũng tải nạp được những mô ghép khí quản CF người chưa được biệt hóa, nhưng vec tơ này không tải nạp được mô ghép khác loài khi biểu mô đã biệt hóa và vì thế cần phải có các nghiên cứu tiếp theo để xác định xem liệu hệ thống vec tơ mới này có áp dụng được cho GTL bệnh CF hay không.

10.5.3 Chuyển gen qua trung gian adenovirus

Adenovirus (Ad) là một vec tơ đặc biệt hấp dẫn với việc chuyển gen tới đường dẫn khí - một thâm nhiễm tự nhiên biểu mô đường hô hấp. Các vec tơ adenovirus mang cDNA của CFTR được phát triển chủ yếu từ Ad-2 và Ad-5 của phân giống (subgenus) C. Các nghiên cứu *in vitro* đã kiểm tra sự chuyển gen CFTR qua trung gian adenovirus bao hàm cả sự tải

nạp các dòng tế bào CF (Mittereder và cộng sự., 1994), những lớp đơn biểu mô phân cực từ các dòng tế bào CF (Mittereder và cộng sự., 1994; Rich và cộng sự., 1993; Zabner và cộng sự., 1994) và những mẫu lấy từ phế quản và mũi người, mới phân lập từ các bệnh nhân CF (Rosenfeld và cộng sự., 1994). Adenovirus xuất hiện lần đầu tiên trong việc chuyển cDNA của CFTR người tới phổi chuột bông *in vivo* bằng vec tơ Ad-5-CFTR (Rosenfeld và cộng sự., 1992). mRNA của CFTR đã phát hiện được ở ngày thứ nhất và sự chuyển gen kéo dài trên 4 tuần lễ. Protein CFTR người phát hiện có trong các tế bào biểu mô đường dẫn khí 11-14 ngày sau khi cấy truyền. Những kết quả tương tự cũng thu được trong các nghiên cứu đơn khác ở chuột bông (Yei và cộng sự., 1994) và các thí nghiệm đã được lặp lại (Zabner và cộng sự., 1994). Việc chuyển gen CFTR qua trung gian Ad tới khoang mũi chuột chuyển gen CF (Cftr^{m1UNC}) cũng đã được đề cập. Tuy nhiên, ngay cả với độ chuẩn cao của Ad-CFTR thì vẫn chỉ thấy thay đổi chút ít về sự vận chuyển chloride và không hiệu chỉnh được sự khiếm khuyết natrium (Grubb và cộng sự., 1994). Ngược lại, Yang và cộng sự đã phát hiện thấy protein CFTR được biểu hiện từ một Ad tái tổ hợp đã loại bỏ E2a thể hệ thứ hai có mang cDNA của CFTR sau khi được chuyển tới chuột Cftr^{m1UNC}. Chuột được truyền 2×10^9 pfu Ad-CFTR đã phát hiện thấy CFTR trong 80% phế quản ở thời điểm 21 ngày (Yang và cộng sự., 1994). Sự chuyển gen qua trung gian Ad của gen CFTR tới động vật linh trưởng cũng được biểu hiện qua đường dẫn khí (Brody và cộng sự., 1994; Engelhard và cộng sự., 1993; Zabner và cộng sự., 1994). Hầu hết các tế bào xác định có ở phổi đều có thể bị thâm nhiễm kể cả tế bào biểu mô bề mặt khí quản, phế quản, tiểu phế quản, các tế bào đáy, tế bào biểu mô trụ, các tế bào lông nhung, các hạch dưới niêm mạc và túi phổi (Bouti và cộng sự., 1994; Engelhard và cộng sự., 1993). Người ta đã chứng minh rằng *in vivo*, tính miễn cảm của các tế bào đường dẫn khí với Ad-5 có thay đổi, các tế bào hình trụ rõ ràng giảm tính miễn cảm so với các tế bào đáy. Sự tổn thương của các tế bào trụ lại làm tăng sự tải nạp adenovirus (Grubb và cộng sự., 1994). Những sự khác biệt này về hiệu ứng thâm nhiễm có thể có liên quan tới sự biểu hiện khác nhau của các protein kết dính chủ yếu và các protein hòa nhập β_5 integrin. Những protein này biểu hiện cao ở những tế bào không được biệt hóa nhưng biểu hiện rất thấp ở các tế bào trụ đã biệt hóa (Gold và Wilson, 1995). Một nghiên cứu khác còn mở rộng tới cả việc kiểm tra mô của bệnh nhân và phát hiện rằng mũi và khí quản không biểu hiện β_5 integrin, nhưng integrin lại có mặt ở các tế bào biểu mô của đường dẫn khí ngoại biên (Goldman và cộng sự., 1996). Trong công trình nghiên cứu lâm sàng đầu tiên về sự chuyển gen CFTR qua trung gian Ad, Zabner và cộng sự đã sử dụng vec tơ Ad-2 chuyển tới mũi 3 bệnh nhân CF tình nguyện. Niêm mạc mũi được sử dụng như là một mô hình tốt đối với sự chuyển gen tới đường dẫn khí bởi vì nó nhạy cảm hơn cũng như có thể đánh giá về độ an toàn và tính hiệu quả tương đối dễ dàng. Biểu mô mũi liên hệ với phổi và người ta đã biết rõ ràng những đặc tính bất thường trong việc vận chuyển ion của CF. Nếu đo được cả lượng natrium và chloride vận chuyển thì có thể đánh giá được *in vivo* bằng các số đo về những khác biệt tiềm tàng (potential difference-PD). Tất cả những số liệu đo được sẽ cho phép phân biệt một cách tin cậy bệnh nhân CF với những người không có bệnh (Knowles và cộng sự., 1995; Middleton và cộng sự., 1994). Trong nghiên cứu của Zabner và cộng sự người ta đã quan sát thấy có sự viêm nhiễm cục bộ xung quanh vị trí được xử lý, có lẽ nó liên quan tới phương pháp chuyển gen. Người ta thấy rằng mRNA của CFTR phát hiện thấy ở 2 đối tượng và theo dõi những biến đổi về sự vận chuyển natrium và chloride đi ra và đi vào ở cả 3 bệnh nhân đều thấy ở mức bình thường. Những biến đổi này kéo dài trên 10 ngày sau mỗi lần xử lý, tuy nhiên nghiên cứu

này vẫn chưa thiết lập được thời gian biểu hiện (Zabner và cộng sự., 1993). Những số liệu thu được từ công trình nhỏ này là điều khích lệ, nhưng cũng cần lưu ý rằng sự viêm nhiễm của biểu mô có thể sẽ làm ảnh hưởng tới một vài số đo về sự vận chuyển natrium, và những thí nghiệm tiếp theo khảo sát về sự chuyển gen CFTR tới mũi cũng cần phải xem xét lại về phương pháp đánh giá sự đáp ứng với chloride.

Theo quy trình lâm sàng tiếp theo của Crystal và cộng sự, các bệnh nhân được nhận vec tơ Ad-5-CFTR ở biểu mô mũi, thì mRNA của CFTR thấy có ở một trong số 4 bệnh nhân và một protein thấy ở những bệnh nhân khác (Crystal và cộng sự., 1994). Các nghiên cứu về điện sinh học của 9 bệnh nhân cho thấy 30% được cải thiện tới mức bình thường về sự tiết chloride trên 2 tuần sau khi được xử lý. Cũng không thấy bằng chứng về sự hủy hoại biểu mô do cảm ứng bởi vec tơ ở bất kỳ bệnh nhân nào (Hay và cộng sự., 1995).

Thí nghiệm thứ 3 không giống như các thí nghiệm trước, ở đây người ta bí mật đưa vào biểu mô mũi 12 bệnh nhân CF các thuốc vờ (placebo) với 4 liều lượng khác nhau của adenovirus hoặc placebo (Boucher và cộng sự., 1994). mRNA của CFTR từ adenovirus đã phát hiện thấy ở 5 trong số 6 bệnh nhân được nhận vec tơ ở liều cao nhất. Tuy nhiên, không thấy có những biến đổi rõ ràng về sự vận chuyển chloride và natrium. Ở những liều thấp hơn của vec tơ không thấy có hiệu ứng gây độc nhưng ở liều cao nhất (độ chuẩn 2×10^{10}) thì 2 trong 3 bệnh nhân xuất hiện viêm niêm mạc (Knowles và cộng sự., 1995).

Nhiều thí nghiệm cũng khởi đầu đánh giá hiệu ứng chuyển giao Ad-CFTR tới phổi. Cũng như việc áp dụng adenovirus ở mũi, Crystal và cộng sự đã sử dụng vec tơ Ad-CFTR tới đường hô hấp dưới bằng cách qua ống soi phế quản. Một mẫu phế quản thấy dương tính với protein CFTR (Crystal và cộng sự., 1994). Tuy nhiên, một trong số các bệnh nhân (những người được nhận liều cao nhất 1×10^{10} pfu) tăng huyết áp, sốt và có các triệu chứng về hô hấp, có lẽ là do phản ứng viêm xảy ra ở phổi. Phát hiện này chứng tỏ rằng những biến đổi đó có thể liên quan tới việc tăng interleukin-6 (IL-6), có lẽ đó là kết quả trực tiếp của sự thâm nhiễm adenovirus. Tất cả các triệu chứng lâm sàng sẽ được giải quyết trọn vẹn một tháng sau đó (McElvaney và Crystal, 1995). Những kết quả tương tự cũng thu được ở các thử nghiệm khác trên phổi. Trong quy trình này (Dorkin, 1998) thì trên 2×10^9 đơn vị thâm nhiễm (infectious units -IU) của vec tơ CFTR cơ sở Ad-2 đã được chuyển giao bằng ống soi phế quản; mRNA của CFTR cũng được phát hiện thấy có liều lượng cao hơn nhưng có thay đổi về vị trí viêm nhiễm ở hầu hết các bệnh nhân. Ngược lại, một khía cạnh khác của nghiên cứu này được đề cập (Dorkin, 1998) là vec tơ Ad lại được chuyển giao bằng khí dung. Đã phát hiện thấy mRNA của CFTR từ vec tơ nhưng không có độc tính đi kèm (David Meeker). Các số liệu từ các thử nghiệm khác đánh giá việc chuyển giao bằng khí dung của các vec tơ Ad-CFTR cũng cho thấy không thể hiện độc tính một cách rõ ràng (Bellon và cộng sự., 1997).

Những thí nghiệm trên lâm sàng đánh giá hiệu lực của việc lặp lại Ad-CFTR cũng đã được thực hiện. Nhằm mở rộng thử nghiệm GTL bệnh CF, Zabner và cộng sự đã thăm dò việc sử dụng lặp lại các vec tơ Ad-CFTR (Ad-2-CFTR2) ở biểu mô mũi (Zabner và cộng sự., 1996). Sáu bệnh nhân được nhận những liều tăng gấp 4-5 lần (từ 2×10^7 IU tới 1×10^{10} IU) vec tơ Ad-CFTR (Ad-2-CFTR2) ít nhất 28 ngày. Tuy nhiên, chỉ có một lỗ mũi được xử lý sao cho có thể lặp lại lần thứ hai để làm đối chứng cho việc xác định hiệu lực của sự chuyển gen CFTR. Mặc dầu không có sự khác biệt thống kê giữa mũi được xử lý và không được xử lý, nhưng bệnh nhân không thấy có dấu hiệu biến đổi trong đáp ứng kích thích tiết chloride sau khi xử lý bằng Ad-2-CFTR, những biến đổi này đạt tối đa ở liều lượng 2×10^{10} .

Giảm hiệu chỉnh vận chuyển chloride song hành với những bằng chứng về đáp ứng miễn dịch ở liều 2×10^9 và những liều cao hơn nữa. Bản chất của đáp ứng miễn dịch có thể thay đổi, nhưng trong một số bệnh nhân người ta thấy có sự tăng nhất thời IgG huyết thanh, một số khác lại biến đổi trong đáp ứng kháng thể đối với các protein Ad đặc hiệu trong đó có cả protein nhận diện các epitope mới. Một số nhà khoa học cho rằng, giảm hiệu chỉnh CFTR là do đáp ứng miễn dịch thể dịch đối với adenovirus, do vậy ngăn chặn sự thâm nhiễm tiếp theo của vec tơ này. Tuy nhiên cũng cần phải lưu ý rằng những số liệu bước đầu từ các thử nghiệm khác nhằm đánh giá việc sử dụng lặp lại vec tơ Ad-CFTR trên phổi thì lại không thấy bằng chứng tăng kháng thể với vec tơ này sau 2-3 lần sử dụng lặp lại adenovirus (Harvey và cộng sự., 1997).

10.5.4 Chuyển gen qua trung gian virus adeno liên hợp

Virus adeno liên hợp (adeno-associated virus - AAV) là virus DNA chuỗi đơn, có tiềm năng hợp nhất vào hệ gen vật chủ, thường ở cùng vị trí trên NST số 19. Các virus trợ giúp như adenovirus hoặc herpes có nhiệm vụ làm tăng hiệu quả thâm nhiễm của virus, như vậy là AAV khiếm khuyết sao chép một cách tự nhiên. Khả năng đóng gói tối đa của các vec tơ AAV vào khoảng 4,5-5 kb, vừa đúng bằng kích cỡ cài và đóng gói cDNA của CFTR (Flotte và cộng sự., 1992). Các vec tơ được thiết kế bằng cách loại đi một hoặc cả 2 gen *rep* và *cap*. Tuy nhiên, nếu loại bỏ một số protein REP thì sẽ mất tính ưu đãi đối với việc hợp nhất NST 19, vì vậy vec tơ AAV thường tồn tại dưới dạng episome (Afione và cộng sự., 1996; Kearns và cộng sự., 1996). Các vec tơ AAV-CFTR được dùng để tải nạp các dòng tế bào CF (Egan và cộng sự., 1992) cũng như các mô sơ cấp (polyp mũi CF) *in vitro* (Flotte và cộng sự., 1992). RNA và protein của CFTR ngoại sinh tồn tại 6 tháng ở thỏ sau khi được truyền cấu trúc AAV-CFTR (Flotte và cộng sự., 1993). Cũng chính nhóm nghiên cứu này đã thông báo có DNA vec tơ AAV ở các tế bào biểu mô đường dẫn khí của khỉ rhesus macaques sau khi được truyền vec tơ 3 tháng (Conrad và cộng sự., 1996). Không thấy hiệu ứng đối lập khi dùng liều 1×10^{11} hạt virus. Các thử nghiệm lâm sàng đối với sự chuyển gen AAV-CFTR hiện vẫn đang tiếp tục. Một công trình nghiên cứu theo dõi 300-10000 đơn vị sao chép (replication unit-ru) AAV ở một lỗ mũi (còn lỗ mũi kia nhận thuốc placebo) và một nghiên cứu theo dõi 3000-10000 ru được đưa tới phổi bằng ống soi phế quản (Flotte và cộng sự., 1996). Những số liệu ban đầu cho thấy có bằng chứng về sự chuyển giao DNA. Tuy nhiên, hiệu ứng đầy đủ và các số liệu về độ an toàn thì vẫn còn phải chờ đợi. Một thử nghiệm khác về sự chuyển giao AAV-CFTR lại lấy xoang hàm trên là mô đích cũng đang bắt đầu (Gardner, 1998).

10.5.5 Chuyển gen qua trung gian lipid cationic

Bản chất của việc chuyển DNA qua trung gian liposome cationic là sự tương tác điện giữa DNA (thường ở dạng plasmid) tích điện âm với một hỗn hợp lipid (thường là cationic tích điện dương và lipid trung tính) để tạo nên một phức hợp DNA bọc bởi lipid. Bản chất của tương tác này vẫn chưa rõ và có thể có sự khác biệt giữa các loại lipid cationic. Cơ chế hấp thụ và sự vận chuyển của những phức hợp này qua trung gian tế bào cũng chưa được rõ. Khi chuyển CFTR tới các tế bào HeLa và COS-7 với các lipid cationic DOTMA và DOTAP sẽ sản sinh ra cAMP đặc hiệu tiết chloride ở những dòng tế bào này (Hyde và cộng sự., 1993; McLachlan và cộng sự., 1995) và các tế bào mũi những bệnh nhân CF được

thâm nhiễm *in vitro* bằng cả DC-Chol: DOPE và DOTAP (McLachlan và cộng sự., 1996; Srern và cộng sự., 1995).

In vivo việc chuyển giao DNA plasmid CFTR được phức hợp với liposome và được đưa qua khí quản chuột thì thấy những bản phiên mã mRNA của CFTR đặc hiệu người có ở phổi tới 4 tuần lễ (Yoshimura và cộng sự., 1992). 3 liposome cationic khác nhau đã được sử dụng để chuyển các plasmid chứa CFTR tới chuột chuyển gen CF. Hyde và cộng sự (1993) đã truyền liposome cationic (DOTMA –DOPE) phức hợp với cDNA của CFTR qua đường khí quản chuột chuyển gen *Cftr*^{m1Cam} thì thấy có sự phục hồi cAMP kích thích tiết chloride. Các phức hợp Nebulized DC-Chol: DPOE CFTR cDNA được chuyển tới chuột *Cftr*^{m1HGU} đã hiệu chỉnh sự khiếm khuyết chloride của CF ở khí quản và ở một phạm vi nhỏ trong mũi (Alton và cộng sự., 1993) nhờ việc đưa trực tiếp vào mũi và truyền qua khí quản chuột chuyển gen DNA plasmid CFTR phức hợp DOTAP (McLachlan và cộng sự., 1996). Trong một nghiên cứu tương tự khi sử dụng liposome cationic DMRIE-DOPE người ta đã phát hiện thấy mRNA CFTR của người có ở chuột sau khi truyền 3 ngày (Logan và cộng sự., 1995). Trong hầu hết các trường hợp, nếu có chức năng CFTR nội sinh thì cũng không thể phân biệt được với sự biểu hiện chức năng của gen chuyển CFTR. Một vài thử nghiệm lâm sàng của liposome –DNA phức hợp với biểu mô bì mũi các bệnh nhân CF cũng đã được thực hiện. Không thấy có vấn đề gì về tính an toàn cả trên lâm sàng cũng như trong phân tích bán định lượng ngẫu nhiên các sinh thiết mũi. Cả cDNA plasmid và mRNA của CFTR đã phát hiện thấy ở sinh thiết mũi của 5 trong số 8 mẫu CFTR đã được điều trị.

Gill và cộng sự cũng đã có thử nghiệm ứng dụng liposome cationic DC-Chol: DPOE, nhưng công thức hơi khác một chút cùng với cDNA của CFTR và được hướng bởi đoạn lặp tặn RSV dài (Gill và cộng sự., 1997). Trong nghiên cứu này 12 đối tượng CF được nhận ngẫu nhiên một trong hai liều cDNA của CFTR (40 và 400mg) hoặc placebo. Không thấy có vấn đề gì về độ an toàn cần phải cảnh báo. Khi sử dụng các phân tích mẫu lấy từ mũi sau 5 ngày đưa DNA/liposome *in vivo*, đo PD ở các khoảng đều đặn ở 8 đối tượng được trị liệu CFTR thì 6 đối tượng chắc chắn có sự thay đổi phục hồi tiết chloride. Trong đa số các trường hợp, mức độ hiệu chỉnh cũng chỉ có giới hạn nhất định, Tuy nhiên, có 2 bệnh nhân có đáp ứng chloride ở thang của người không bị bệnh CF. Điều thú vị là những biến đổi này kéo dài hơn so với các số liệu được báo cáo trước đây (chỉ kéo dài 7 ngày). Sự khác biệt này có thể phản ánh hiệu ứng của việc sử dụng promoter LTR của RSV vì nó kháng lại promoter sớm của SV40 đã được dùng để biểu hiện CFTR ở thí nghiệm trước.

Trong một quy trình khác thì lipid cationic được sử dụng là DPOTA (Boehringer, Mannheim, Mannheim, Germany) và cDNA của CFTR được dẫn bởi promoter CMV (Porteous và cộng sự., 1997). 16 đối tượng CF đã được nghiên cứu, 8 người được điều trị với liều 400µg và 8 người dùng thuốc placebo. Cũng không thấy có vấn đề gì về tính an toàn. DNA vec tơ phát hiện thấy trong 11/18 bệnh nhân ở ngày thứ 3 và thứ 7, có 2 bệnh nhân phát hiện thấy ở ngày 28. mRNA từ vec tơ cũng phát hiện được ở 2 bệnh nhân vào ngày thứ 3 và thứ 7, trong khi đó không thấy có những biến đổi lớn về sự vận chuyển chloride do được hiệu chỉnh, mức biến đổi trung bình là 20% giới hạn bình thường.

Gần đây đã có các liposome cationic mới đặc hiệu cho GTL (Lee và cộng sự., 1996; Wheeler và cộng sự., 1996). Một trong số các liposome thế hệ 2 hứa hẹn nhất là GL67 (Genzyme Corp, Framingham, MA, USA) đang được đánh giá. Lipid này được thử nghiệm đầu tiên ở mũi trong đó DNA plasmid CFTR phức hợp với GL67 được đưa vào một mũi và DNA plasmid CFTR được đưa vào lỗ mũi kia. Điều thú vị là , mặc dầu có sự hiệu chỉnh tốt

trong đáp ứng chloride nhưng không thấy có sự khác biệt rõ ràng giữa 2 cách điều trị, hiệu ứng ở đây là tổng hiệu ứng của DNA và lipid (Zabner và cộng sự., 1997). Một lợi thế của GL67 là nó như là một tác nhân chuyển giao DNA nhưng lại là một lipid cationic mà có thể chuyển giao được bằng khí dung tới đường dẫn khí (Chadwick và cộng sự., 1997; Eastman và cộng sự., 1997; 1998). Một thử nghiệm lâm sàng đánh giá hiệu lực của khí dung trong chuyển giao cDNA của CFTR tới phổi các bệnh nhân CF cũng đã hoàn tất. Mặc dầu vậy cũng cần phải lưu ý rằng, các đối tượng được điều trị bằng DNA-lipid có đáp ứng giống như bị cúm nhẹ trong khoảng 24 giờ (Alton và cộng sự., 1998). Sự phát hiện này cho phép suy luận rằng vì thiếu sự methyl hóa của DNA từ vi khuẩn do đó có thể cảm ứng đáp ứng viêm. Cũng chưa rõ là liệu nó có ý nghĩa đối với sự chuyển giao DNA liposome cationic dài hạn để trị liệu CF hay không và cũng chưa thấy thông báo về việc cho phép sử dụng lặp lại phức hợp liposome –DNA tới chuột chuyển gen CF. Trong nghiên cứu này độ hiệu chỉnh sự tiết chloride chỉ thấy ở liều kép CFTR/DC-Chol:DOPE sau 10 ngày, không có khác biệt đáng kể với việc sử dụng liều đơn (Goddard và cộng sự., 1997). Một thử nghiệm lâm sàng đánh giá 3 liều lượng thích hợp của liposome-DNA cho các bệnh nhân CF với thời gian 28 ngày cũng được thực hiện. Những số liệu ban đầu về độ an toàn cũng không có vấn đề gì đáng lo ngại trên lâm sàng cũng như không thấy các trở ngại trong lĩnh vực miễn dịch học (Southern và cộng sự., 1997). Cuối cùng là 2 thử nghiệm khác sử dụng các liposome cationic khác nhau để chuyển cDNA của CFTR tới các bệnh nhân CF cũng đã được bắt đầu (Knowles và cộng sự., 1998; Sorscher, 1998; Sorcher và cộng sự., 1994).

10.5.6 Các hệ thống chuyển gen khác

Vẫn còn một vấn đề mà các công trình nghiên cứu cần phải tiếp tục đó là việc kiểm tra sự biến đổi của các hệ thống chuyển gen. Tuy nhiên, người ta đã thấy rõ là việc điều trị bệnh xơ nang có thể áp dụng liệu trình dài hạn. Cách tiếp cận hứa hẹn nhất là dùng các receptor đặc hiệu cho sự chuyển gen qua trung gian. DNA được gắn vào một ligand thích hợp, nó sẽ tương tác với một receptor biểu lộ trên bề mặt tế bào. Một số receptor đã được sử dụng, nhưng hầu hết các nghiên cứu đều chỉ rõ rằng sự hấp thu của các tế bào biểu mô đường hô hấp là do các receptor globulin miễn dịch tổng hợp (Ferkol và cộng sự., 1993). Sự thông minh là ở chỗ thông qua bề mặt ưa kiềm của các tế bào biểu mô mà cộng hợp ligand-DNA được phân phối tới tận tĩnh mạch. Khi chuyển được DNA vào cả phổi và gan thì sẽ biểu hiện tức thời và kéo dài 7 ngày (Ferkol và cộng sự., 1995), khi xử lý lặp lại thì thấy sự biểu hiện gen giảm đáng kể (Ferkol và cộng sự., 1996). Sự giảm sút này là do sự đáp ứng kháng lại các thành phần kháng thể trong cộng hợp và vì vậy làm giảm tính kháng nguyên của các kháng thể đã sử dụng.

Có 2 cách tiếp cận để chấp nhận trong GTL. Trước hết là cách kiến tạo các NST nhân tạo. Theo cách này thì sẽ sử dụng các trình tự hệ gen CFTR trong một cấu trúc có chứa các thành phần thiết yếu của NST như tâm động (centromere) và phần cuối của NST (telomere). Tuy mới chỉ là lý thuyết, nhưng trong những nghiên cứu trước đây người ta đã từng sử dụng NST nhân tạo của nấm men có mang CFTR nên điều đó lại càng khích lệ các nhà nghiên cứu (Mogayzel và cộng sự., 1997). Cuối cùng là một nghiên cứu nhắm vào sự biến đổi đặc hiệu của thể đột biến $\Delta F508$ nhờ tái tổ hợp. Chiến lược này đã biến các đoạn nhỏ tương đồng thành trình tự của dạng hoang dã trong đó có các đột biến $\Delta F508$. *In vitro*, khi phân tích về chức năng phân tử cho thấy nó đã tới được đích của gen. Tuy

nhiên, tần suất tổ hợp tương đồng xác định được là khoảng 10^{-5} đến 10^{-6} . Với tần suất như vậy, đó là điều khích lệ cho việc ứng dụng được mở rộng hơn (Kunzelmann và cộng sự., 1996).

10.6 Kết luận

Chúng ta có thể rút ra kết luận thế nào về tính thực dụng của những hệ thống chuyển gen đối với việc điều trị bệnh xơ nang, đặc biệt đối với các thử nghiệm lâm sàng? Qua kết quả của nhiều công trình nghiên cứu đánh giá việc chuyển gen qua trung gian Ad người ta đã rút ra một số vấn đề thú vị, trước hết là sự đáp ứng với vật chủ của các virus. Các nghiên cứu tiền lâm sàng cũng như lâm sàng cho thấy, khi đưa các vec tơ Ad tới đường dẫn khí của những bệnh nhân ở vùng nhiệt đới thì thấy sự viêm nhiễm phụ thuộc vào liều lượng và thời điểm xử lý (Brody và cộng sự., 1994; Crystal và cộng sự., 1994; Engelhardt và cộng sự., 1993; Knowlea và cộng sự., 1995; Simon và cộng sự., 1994). Theo những nghiên cứu này thì sự viêm nhiễm có liên quan tới tính kháng nguyên của các protein bọc adenovirus, nó cảm ứng đáp ứng lympho T gây độc tế bào dẫn đến sự hủy hoại các tế bào đã thâm nhiễm virus và vì thế mà làm mất sự biểu hiện gen chuyển (Yang và cộng sự., 1995). Những nghiên cứu này đã kiến tạo được các virus thế hệ thứ hai với E2a bất hoạt. Những vec tơ này phải biểu hiện dài hơn nữa gen tái tổ hợp và giảm sự viêm nhiễm (Engelhardt và cộng sự., 1994; Yang và cộng sự., 1994). Một cách khác là khi dùng các thuốc kiểm chế miễn dịch như cyclosporin và dexamethasone - điều hòa xuống các đáp ứng miễn dịch thì thấy sự biểu hiện các gen ngoại sinh trong đường dẫn khí của chuột bông được kéo dài (Zsengeller và cộng sự., 1995). Tuy nhiên, giới hạn nhất đối với việc sử dụng các adenovirus là nó sinh ra các kháng thể trung hòa nên làm giảm khả năng chuyển gen của virus thứ hai nếu được sử dụng (Kozarsky và cộng sự., 1994; Smith và cộng sự., 1993; Zabner và cộng sự., 1996). Các nghiên cứu trên chuột chuyển gen cho thấy các tế bào T cũng góp phần quan trọng vào sự hình thành các kháng thể trung hòa trong đường dẫn khí do đó gây trở ngại cho việc chuyển gen qua trung gian adenovirus kế tiếp (Yang và cộng sự., 1995). Vì thế cần phải khắc phục được vấn đề tăng cường miễn dịch khi sử dụng lặp lại vec tơ. Chẳng hạn như với interleukin -12, nếu được dùng cùng thời điểm với lần sử dụng lần đầu của Ad thì sẽ ngăn chặn đặc hiệu sản xuất IgA và sẽ làm giảm tới 20 lần độ chuẩn kháng thể trung hòa và duy trì được sự biểu hiện gen khi sử dụng lại các vec tơ (Yang và cộng sự., 1995).

Vấn đề chính có liên quan tới sự chuyển gen qua trung gian liposome cationic tới đường dẫn khí là tính hiệu quả. Hiện nay với nền tảng phân tử DNA thì các vec tơ virus có hiệu quả hơn liposome. Cũng chưa rõ là ở thời điểm nào của quá trình vận chuyển mà một lượng lớn DNA đã bị mất đi sau sự chuyển giao qua liposome. Tuy nhiên, trong các nghiên cứu trước thì hàng rào ngăn cản lớn nhất là các lối dẫn bên trong tế bào và màng nhân (Zabner và cộng sự., 1995). Nếu có sự tham gia của các tác nhân được lý học thì sẽ giải quyết được vấn đề này. Cũng cần phải bổ sung là phải có các nghiên cứu một cách hệ thống về việc sử dụng lặp lại các liposome cationic. Mặc dầu vậy, người ta thấy vẫn có thể duy trì được sự biểu hiện gen khi dùng lặp lại phức hợp liposome - DNA tới đường dẫn khí (Goddard và cộng sự., 1997; Scheule và cộng sự., 1997). Cũng không rõ là nó có hiệu ứng dài hạn trên các cấu trúc ở phổi hay không.

Cuối cùng, vấn đề đặc hiệu lâm sàng đối với CF cũng cần phải đề cập. Trong đường dẫn khí của các bệnh nhân CF có rất nhiều chất tiết do thâm nhiễm cũng như nuclease ngoại

và nội sinh có thể làm biến đổi lớn hiệu ứng chuyển gen. Các nghiên cứu *in vitro* cho thấy thực chất dịch nhầy cũng làm ngăn cản liposome – DNA và sự chuyển gen qua adenovirus. Tuy nhiên, việc sử dụng các tác nhân tiêu chất nhầy như DNase có thể lại làm giảm đáng kể hiệu ứng ức chế (Stern và cộng sự., 1998). Cũng cần phải khảo sát đánh giá thêm về mức độ thành công của GTL đối với bệnh xơ nang. Với các kỹ thuật *in vivo* về điện sinh học thì cũng mới chỉ xác định được những khác biệt ở mũi, còn việc so sánh những khác biệt niêm mạc (PD) ở đường dẫn khí thì yêu cầu phải có những kỹ thuật phức tạp hơn nhiều. Tuy nhiên, những số liệu ban đầu đã chứng minh được rằng GTL rất khả thi đối với bệnh xơ nang (Alton và cộng sự., 1996). Mặt khác, những vấn đề lâm sàng chuyên sâu cũng cần phải đầu tư nhiều hơn nữa. Chẳng hạn như cần phải khảo sát các số liệu về độ kết dính vi khuẩn, sự biến đổi lưu biến học các chất nhầy (mucus rheology) hoặc MCC và sự sàng lọc sinh học phóng xạ cũng cần phải được áp dụng trong các quy trình sau này. Việc phân tích các số liệu liên quan tới hậu quả trị liệu cũng rất cần thiết trong tương lai vì GTL bệnh xơ nang vẫn còn rất nghèo nàn về nguyên lý cũng như những kỹ thuật cụ thể.

Chương XI

ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH THUỘC HEMOGLOBIN

11.1 Mở đầu

Các bệnh thuộc hemoglobin đại diện cho mô hình khiếm khuyết gen, bao gồm sự thiếu hụt trong biểu hiện gen - chứng thiếu máu vùng biển (thalassaemia syndrome) – trong đó

những biến thể protein đã bị thay đổi chức năng (sự trùng hợp của haemoglobin S ở bệnh tế bào liềm) và giải ức chế gen (bệnh di truyền liên quan tới hemoglobin bào thai).

Bệnh thiếu máu vùng biển β và bệnh tế bào liềm - đó là các đích đầu tiên của GTL, vì các lý do sau đây:

1. Gen β globin nhỏ, chỉ khoảng 2 kb, được biểu hiện tốt, sau khi chuyển vào chuột chuyển gen đạt mức như các gen globin chuột và đặc biệt là dòng hồng cầu ở giai đoạn biệt hóa và không thấy có hiệu ứng phụ trên chuột (Stamatoyannopoulos và Nienhuis, 1994).
2. Về vấn đề đích thì tế bào gốc tạo máu có thể phục hồi quần thể dài hạn *in vivo*, có thể được thu nhận từ máu hoặc tủy xương và được công nghệ hóa *in vivo* cũng như cấy ghép.
3. Mô hình trên chuột là thích hợp với bệnh thiếu máu vùng biển β và bệnh tế bào liềm.
4. Ngay từ năm 1986 chuột thiếu máu vùng biển (TMVB) β đã được cứu sống khi truyền gen globin người vào tế bào mầm (Constantini và cộng sự., 1986).
5. Người ta đã hiểu chi tiết về các trình tự điều hòa.
6. Sự khiếm khuyết phân tử của các bệnh thuộc hemoglobin tác động lên tất cả các bước từ gen tới protein đều rất rõ ràng và có thể ứng dụng các chiến lược khác nhau để thêm vào hoặc thay thế hoặc hiệu chỉnh các gen globin.

Sự hoạt hóa gen hemoglobin bào thai nhằm bù lại sự khiếm khuyết gen β globin hoặc giảm hiệu ứng loại bỏ đột biến kiểu hình của tế bào là các chiến lược GTL gián tiếp

Bảng 11.1 Các phương pháp điều trị bệnh thuộc hemoglobin bằng gen hoặc RNA

Locus β globin

Thêm gen hoặc thay thế gen (1,2)

Hiệu chỉnh đột biến (1,2)

Hoạt hóa gen β

Locus β globin

hoạt hóa gen β (1)

Bất hoạt gen β LCR (1)

RNA globin

Bản phiên mã β : Hiệu chỉnh ghép nối (1)

β antisense, ribozyme (1)

Các gen khác

Thêm gen tạo hồng cầu (1)

Các enzyme tế bào hồng cầu

2,3-biophosphoglycerate mutase (antisense) (2)

2,3-biophosphoglycerate phosphatase (thêm gen) (2)

Các enzyme kháng oxy hóa (1)

Ghi chú:

1: Thiếu máu vùng biển β

2: Bệnh tế bào liềm

Gen trị liệu trực tiếp các bệnh thuộc hemoglobin cũng đã được bắt đầu ngay từ năm 1980 với việc thêm gen β globin người bình thường vào các tế bào tủy xương nuôi cấy của 2 bệnh nhân TMVB β bằng cách tiêm các tế bào đã thao tác vào các bệnh nhân. Tuy nhiên các kết quả thu được là âm tính và người ta hy vọng là nó không gây tổn hại cho bệnh nhân. Sau sự khởi đầu thất bại này người ta cũng đã thu được thắng lợi khi sử dụng tế bào ngựa Trojan, được chuyển giao bằng một vec tơ retrovirus chuột đã biểu hiện được gen globin trên các tế bào nuôi cấy của bệnh tăng sinh nguyên hồng cầu nguyên bào tủy ở chuột (murine erythroleukaemia cell – MEL).

Mặc dù sự chuyển gen globulin tiềm ẩn nhiều lợi ích, nhưng những bệnh có liên quan tới hemoglobin không còn đứng đầu danh sách GTL nữa, bởi vì sự biểu hiện *in vivo* của gen chuyển globin soma còn lâu mới đạt tới ngưỡng trị liệu và vẫn chỉ giới hạn ở một số ít quần thể tế bào vì chúng không thể hiện được *in vivo* với liệu trình dài hạn.

Bảng 11.2 Trị liệu gen globin

Tiện lợi	Bất lợi
Kích cỡ gen nhỏ (< 2kb) Mô hình hợp với tế bào và động vật Chữa được bệnh TMVB β cho chuột bằng chuyển gen globin người vào dòng mầm. Đã hiểu rõ bệnh lý của bệnh này	Đòi hỏi DNA hệ gen Phân tán các yếu tố điều hòa Biểu hiện cao gen cần cho sự biệt hóa tủy cùng Các tế bào gốc đích chiếm tỷ lệ thấp và tiềm ẩn Đòi hỏi một lượng lớn các tế bào đã được công nghệ hóa và biểu hiện dài hạn các gen chuyển <i>in vivo</i>.

Nhiều nghiên cứu cơ bản đã được thực hiện nhằm cải tiến, nâng cao hiệu ứng chuyển gen cũng như biểu hiện gen chuyển globin soma và các tế bào gốc có thể được sử dụng để chuyển gen.

11.2 Vec tơ retrovirus cho globin

Vec tơ retrovirus bệnh bạch cầu chuột Moloney là vec tơ khởi đầu có hiệu ứng đối với việc chuyển gen nghiên cứu vào các tế bào tạo máu chuột *in vitro*. Tuy nhiên, những vec tơ này chỉ có dung lượng nhỏ dưới 10 kb. Để cài các gen nghiên cứu người ta phải lựa chọn các trình tự điều hòa trung tâm có mặt ở vùng kiểm soát locus (locus control region –LCR) của gen β globin và thêm cả DNA hệ gen β globin. Các vec tơ retrovirus đòi hỏi các tế bào đích phải phân chia thì mới hợp nhất được vào hệ gen của tế bào. Các tế bào gốc tiềm tàng hoạt tính phục hồi quần thể dài hạn *in vivo*, các nghiên cứu đương thời đã tăng số tế bào *ex vivo* cảm ứng chu trình tế bào mà không có biệt hóa để cải biến các dòng tế bào đóng gói nhằm tạo được độ chuẩn cao của các vec tơ, có khả năng tải nạp các tế bào gốc của người và duy trì sự biểu hiện gen chuyển ở mức cao.

Để biểu hiện được ở mức cao và đặc hiệu với hồng cầu thì gen globin hệ gen phải theo hướng ngược lại, dưới sự kiểm soát của promoter, có liên quan với các vị trí nhạy cảm cao của LCR (hypersensitive site -HC). Tuy nhiên, do thường xuyên có sự sắp xếp lại và các vị trí nổi lồi hoặc vị trí kết thúc poly A luôn được nảy sinh bởi sự ngược hướng do đó phải gây đột biến trực tiếp điểm để nâng cao tính ổn định của vec tơ và biểu hiện gen bình thường ở các tế bào đích (Leboulch và cộng sự., 1994; Sadelain và cộng sự., 1995).

Các tế bào MEL được dùng để nghiên cứu sự biểu hiện các bản phiên mã đơn của gen globin tải nạp tương phản với các đoạn trùng lặp được cảm ứng bởi sự thâm chuyển DNA. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy, sự biểu hiện của provirus bản phiên mã đơn có thể bị biến đổi và có liên quan tới vị trí hợp nhất ngẫu nhiên (Bender và cộng sự., 1989), khi có các yếu tố điều hòa hoạt hóa *cis* nằm gần chính giữa. Mức độ biểu hiện gen chuyển globin là thấp ở các tế bào MEL tải nạp khi so sánh với các gen globin chuột nội sinh (Bender và cộng sự., 1989; Dzierzak và cộng sự., 1988; Karlsson và cộng sự., 1987; Kasahara và cộng sự., 1994; Leboulch và cộng sự., 1995). *In vivo*, sự biểu hiện dài hạn gen chuyển globin người cũng không xuất hiện một cách thường xuyên, điều đó cho thấy rất hiếm khi đạt được sự tải nạp các tế bào gốc khôi phục quần thể dài hạn. Sự biểu hiện của gen chuyển β globin thấp hơn 5% gen β globin chuột nội sinh.

Sự phát hiện ra HS của LCR điều khiển từ xa đã kích lệ các nghiên cứu nhằm xác định vị trí của LCR hoặc sự tổ hợp của các vị trí – đó là phương pháp hiệu lực nhất để biểu hiện gen globin. Giới hạn về dung lượng kích cỡ các vec tơ retrovirus đối với gen chuyển ngoại lai là do vùng LCR chỉ cho phép giới hạn ở 20 kb đối với các đoạn DNA nhỏ ở trung tâm nhưng có rất nhiều mô tip hoạt chuyển. Vị trí HS2 của LCR là vị trí hoạt hóa nhất (Caterina và cộng sự., 1991; Collis và cộng sự., 1990; Curtin và cộng sự., 1989; Forrester và cộng sự., 1989; Grosveld và cộng sự., 1987; Leboulch và cộng sự., 1995; Phillipsen và cộng sự., 1990; Ryan và cộng sự., 1989; Talbot và cộng sự., 1990). Các vec tơ retrovirus Ecotropic đã loại vị trí HS được gắn với promoter β globin người biểu hiện 60-70% trong các tế bào MEL khi so sánh với globin nội sinh của chuột. Sự thâm nhiễm của các tế bào tủy xương chuột và sự cấy ghép các tế bào tải nạp vào những đối tượng nhận đã bị bức xạ mạnh cho thấy sự biểu hiện gen chuyển β globin có thể thay đổi, thường cao hơn trường hợp không có LCR, nhưng vẫn dưới ngưỡng đòi hỏi của trị liệu (Chang và cộng sự., 1992; Gelinas và cộng sự., 1992; Novak và cộng sự., 1990; Plavec và cộng sự., 1993; Ellis và cộng sự., 1997). Đáng tiếc là, các cấu trúc mới này hoạt động không ổn định, provirus vẫn có sự sắp xếp lại và độ chuẩn vec tơ thấp.

Sự không ổn định về mặt di truyền được phòng ngừa bằng cách loại thải hệ thống và thay thế trực tiếp vị trí (Leboulch và cộng sự., 1994; Sadelain và cộng sự., 1995). Kết quả là nâng cao được tính ổn định và độ chuẩn của các hợp β LCR trong các tế bào hồng cầu *in vitro* và *in vivo*. Sự biểu hiện của gen chuyển β globin liên quan chặt chẽ với các cấu trúc có 4 vị trí LCR chứa trung bình 78% gen chuột với thang từ 4% đến 146% (Sadelain và cộng sự., 1995). Mặc dầu đã có mặt hầu hết các vị trí LCR hoạt hóa, nhưng sự biểu hiện của gen chuyển β globin soma vẫn còn phải phụ thuộc vào vị trí của nó. Khi thêm vào các vị trí “cách ly” (insulator site) ở cuối cấu trúc LCR gen β globin thì có thể làm giảm sự biến đổi biểu hiện gen β globin (Chang và cộng sự., 1993) và có thể tránh được sự hoạt hóa các gen gây ung thư nằm cạnh vị trí cài của provirus. Sự biểu hiện dài hạn cấu trúc LCR gen β globin ổn định sau tải nạp các tế bào gốc và cấy ghép, đó là điều chúng ta không cần phải băn khoăn nữa (Sadelain và cộng sự., 1995).

Những nghiên cứu này đã cải tiến mẫu hình của các vec tơ retrovirus và giải quyết được 3 vấn đề chính của sự chuyển gen β globin với các vec tơ retrovirus là: tạo được độ chuẩn cao của các vec tơ, ổn định hệ gen tải nạp và biểu hiện gen β globin *in vitro* ở mức cao trong hồng cầu (Leboulch và cộng sự., 1995).

Điều cần thiết đối với các vec tơ có khả năng thâm nhiễm các tế bào gốc người lại đòi hỏi các tế bào đóng gói của người hoặc các tế bào lưỡng tính, những dòng tế bào này không làm giảm độ chuẩn hoặc giảm khả năng tải nạp của vec tơ. Ở chuột, sự biểu hiện của cDNA adenosine deaminase (ADA) dưới sự kiểm soát của đoạn lặp cuối dài của retrovirus đạt 80% ADA nội sinh sau 12-14 tháng cấy ghép (Rivie'ere và cộng sự., 1995). Các đặc trưng đặc biệt của LCR virus đã góp phần làm tăng thời gian biểu hiện của gen ADA ở hầu hết các dòng tế bào có nguồn gốc từ các tế bào gốc khôi phục quần thể dài hạn.

11.3 Các vec tơ virus adeno liên hợp

Các virus adeno liên hợp (adeno-associated virus – AAV) là virus DNA sợi đơn, có 4675 nucleotide, thuộc họ parvovirus. AAV không phải là virus gây bệnh, nó có thể thâm nhiễm vào rất nhiều tế bào người và có thể hợp nhất vào những vị trí đặc hiệu trên NST 19 của người (19q13,3-qter) (Flotte và cộng sự., 1995; Kotin và cộng sự., 1991).

Các trình tự cần cho sự đóng gói, sự hợp nhất và sao chép nằm trong 191 nucleotide, bao gồm cả những đoạn lặp tận đảo ngược (inverted terminal repeats – ITR) (Samulsski và cộng sự., 1989). AAV là virus khiếm khuyết, nó cần phải được cộng thâm nhiễm với virus (adenovirus, hoặc virus herpes simplex) thì mới sao chép được. Các kháng thể kháng AAV có mặt ở 70-80% quần thể.

AAV type 2 đã được sử dụng như một vec tơ biểu hiện các gen chuyển. Kích cỡ cực đại của DNA đóng gói chỉ 4,5 kb. Hầu hết DNA hệ gen đều có thể được thay thế bằng một gen mong muốn bởi vì với đầu tận của AAV (145 nucleotide) là đủ để hợp nhất vec tơ AAV tái tổ hợp vào trong hệ gen vật chủ.

Vấn đề tạp chất của vec tơ AAV do phải bổ sung thêm các virus trợ giúp cho vec tơ thâm nhiễm cũng đã được giải quyết bằng cách xử lý với nhiệt và các bước làm tinh khiết cũng như việc sử dụng các plasmid trợ giúp.

Tuy nhiên, vẫn còn một số vấn đề tồn tại là: (1) rất khó thu được các dòng tế bào đóng gói có khả năng tạo được độ chuẩn cao cho các vec tơ AAV, (2) tái sản xuất các vec tơ AAV, (3) độc tính của protein Rep đối với các tế bào đóng gói và (4) các vec tơ AAV tái tổ hợp chỉ chứa các đầu tận AAV nên có thể làm mất tính đặc hiệu đối với vị trí hợp nhất của NST 19 (Mamounas và cộng sự., 1995; Shelling và Smith, 1994).

Sự thâm nhiễm tế bào của K562 hồng cầu người hoặc các tế bào tạo máu người với vec tơ AAV của β globin có liên quan rất nhiều với các tế bào neo đậu và sự biểu hiện gen chuyển β globin (2,2 kb) được đánh dấu với 6 nucleotide bị loại đi ở vùng 5' không phiên dịch gần với vị trí 2 của LCR (0,4 kb). Các tế bào K562 biểu hiện gen chuyển β ở mức của β nội sinh trong các tế bào cảm ứng biệt hóa hồng cầu (Miller và cộng sự., 1994; Walsh và cộng sự., 1992). Các tế bào tạo máu CD34+ của người thâm nhiễm cao với vec tơ β AAV (500-1000 hạt/tế bào) ở 20-40% quần thể hồng cầu biểu hiện gen chuyển β ở mức 4-71% khi so sánh với các gen nội sinh. Hemoglobin thai nhi (Foetal haemoglobin) (HbF) tăng từ 26% tới 40% sau khi tải nạp AAV trong các tế bào tổ tiên (Millervaf cộng sự., 1993). Sự sắp xếp lại hệ gen vec tơ đi cùng với việc làm mất các trình tự điều hòa có thể xảy ra ở một số dòng tế bào (Miller và cộng sự., 1994). Cuối cùng, DNA vec tơ gốc

có thể sẽ cho một tín hiệu nhân tạo giả của DNA từ một quần thể, do đó cần phải tiến hành RT-PCR để xác định hiệu ứng tải nạp AAV và sự biểu hiện của gen chuyển. Sự hợp nhất của vec tơ AAV trong các dòng hồng cầu vẫn chưa được chứng minh. Tuy nhiên, với một số lượng lớn tế bào (> 1000) lại chỉ từ một tổ tiên thâm nhiễm đơn có thể nói được rằng đã có sự hợp nhất của provirus trong tế bào gen phân dòng này.

Những công trình nghiên cứu gần đây sử dụng gen A β globin có đánh dấu các vị trí HS 2,3 và 4 từ LCR, nhưng không có gen kháng thuốc đã cho thấy có sự hợp nhất cặp đôi và sự biểu hiện chức năng chỉ ở vec tơ AAV có sự thâm nhiễm cao (Hargrove và cộng sự., 1997). Sự biểu hiện dài hạn của gen β globin đã quan sát thấy trong các đối tượng cấy ghép lần đầu, biểu hiện gen β globin nội sinh ở mức 6% trong 1 tháng và ở mức 0,4 % trong các tế bào tủy xương ở những đối tượng được cấy ghép lần thứ hai (Ponnazhagan và cộng sự., 1997).

Dùng các vec tơ cơ sở AAV tái tổ hợp để biểu hiện RNA antisense β globin ở các tế bào K562 là cách tiếp cận gián tiếp để chống lại hiệu quả kiểu hình thiếu máu vùng biển β (Ponnazhagan và cộng sự., 1994).

11.4 Tái tổ hợp tương đồng và sự sửa chữa

Phương pháp lý tưởng để hiệu chỉnh lại gen globin khiếm khuyết và giải quyết vấn đề biểu hiện gen thấp là thay thế vùng DNA bất thường bằng các trình tự bình thường nhờ tái tổ hợp tương đồng (Smithies và Maeda, 1995). Theo phương pháp này thì gen β globin đột biến sẽ được hiệu chỉnh lại trong các dòng tế bào, kể cả các tế bào gốc của phôi (Shesely và cộng sự., 1991). Tuy nhiên, phương pháp này vẫn chưa thể áp dụng được đối với các tế bào gốc tạo máu vì tần số tái tổ hợp ở các vị trí xác thực còn thấp và cần phải nhân lên các tế bào gốc đã được hiệu chỉnh rất hiếm hoi này.

Việc sửa chữa đặc hiệu vị trí của đột biến điểm có thể đáp ứng với bệnh TMVB β bằng cách thâm chuyển các oligonucleotide chimeric đặc hiệu vào các tế bào gốc *ex vivo* (Cole-Strauss và cộng sự., 1996).

11.5 Trị liệu gen gián tiếp bệnh thiếu máu vùng biển β

Do sự muộn màng trong GTL trực tiếp bằng cách thêm vào hoặc thay thế gen thì đã có một cách tiếp cận khác, đó là GTL gián tiếp (bảng 11.1).

11.5.1 Hiệu ứng ghép nối bất thường

Các đột biến gen β globin là do vị trí ghép nối bất thường (β IVS1-110), vị trí này tiềm ẩn rất nhiều so với vị trí bình thường nguyên bản, những trường hợp này rất hay gặp ở các nước thuộc Địa Trung Hải với hội chứng TMVB β . Ở các tế bào nuôi cấy, có thể hoàn trả 100% sự ghép nối bình thường và phục hồi mRNA β globin chức năng bằng cách dùng antisense oligonucleotide để che lấp các vị trí ghép nối bất thường (Dominski và Kole, 1993). Cũng có thể chuyển một gen mã cho RNA antisense, việc phiên mã được kiểm soát bởi promoter globin và LCR trong các tế bào gốc để biểu hiện gen antisense ở giai đoạn cuối biệt hóa hồng cầu.

11.5.2 Hoạt hóa các gen bù

Một cách tiếp cận gián tiếp khác là có thể bù đắp cho các gen β globin khiếm khuyết bằng cách hoạt hóa một gen lặn bình thường có cùng chức năng hoặc tương tự chức năng. Đây là trường hợp của các gen β globin của HbF- một bệnh nghiêm trọng có liên quan tới hemoglobin (Stamtoyapoulos và Nienhuis, 1994). Khi xử lý bằng hydroxyurea sẽ làm tăng mức HbF và giảm tính nghiêm trọng đối với bệnh tế bào liềm (Charache và cộng sự., 1992, 1995). Các tác nhân làm thay đổi độc tính tế bào hoặc làm biến đổi chất nhiễm sắc cũng kích thích sự biểu hiện *in vivo* của gen β globin cũng như các gen tạo hồng cầu (Rodgers và cộng sự., 1993). Vì vậy, tầm xa của GTL đối với các bệnh thuộc hemoglobin là phải có nhiều chiến lược với các tiềm năng khác nhau để nâng cao sự biểu hiện của các gen β globin. Một trong những cách tiếp cận đó là sự chuyển gen tạo hồng cầu (erythropoietin gene-Epo) và các tế bào sao cho chúng có khả năng tiết ra được Epo với các liều lượng được lý *in vivo*.

11.5.3 Chuyển gen tạo hồng cầu

Nhân tố cơ bản của cách tiếp cận này xuất phát từ một hiệu ứng của Epo đối với các bệnh nhân thiếu máu tế bào liềm (Cozma và cộng sự., 1995; El Hazmi và cộng sự., 1995; Rodgers và cộng sự., 1993) và các bệnh nhân TMVB β (Aker và cộng sự., 1995; Olivieri và cộng sự., 1995; Rachmilewitz và cộng sự., 1995). Tuy nhiên, liều lượng gây hiệu ứng lại rất cao và vì rất đắt nên các quy trình thường quy không thể sử dụng được Epo tái tổ hợp.

Các mô hình động vật đã được sử dụng để xác định hiệu ứng của những liều lớn đối với sự biểu hiện HbF. Ở khi đầu chó, với liều rất cao của Epo đã cảm ứng được 60% HbF (Al-Khatti và cộng sự., 1987). Epo tái tổ hợp có khả năng bù đắp sự thiếu máu của chuột TMVB β . Vấn đề này gắn liền với giảm số lượng hồng cầu lưới, nhưng lại tăng thời gian tồn tại của hồng cầu và tăng chút ít khối lượng tạo máu (De Franceschi và cộng sự., 1996).

Với các bệnh nhân TMVB β thì việc hoạt hóa gen β globin (khi đã biểu hiện β) phải đủ cao thì mới tăng được tỷ lệ tạo hồng cầu và tăng thời gian sống của tế bào hồng cầu. Sự hoạt hóa này cũng có thể làm giảm sự phát triển của tủy xương ở những bệnh nhân thiếu máu Cooley nhẹ.

Một công trình nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng sự biểu hiện liên tục gen Epo sau khi tải nạp các tế bào gốc phục hồi quần thể dài hạn không có vec tơ retrovirus thì có khả năng bù đắp các khiếm khuyết di truyền bệnh TMVB β ở chuột (chuột Hbb thal1 đã loại gen chính β) (Viller và cộng sự., 1994). Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của gen chuyển Epo thì vẫn chưa xác định được, tức là hoặc quá cao hay quá thấp chứ hiếm khi ở mức chuẩn xác và thường là nhất thời. Chuột TMVB β trước khi được cấy ghép các tế bào tủy xương đã biến đổi gen thì phải tia xạ. *In vivo*, ở một mức độ nào đó người ta đã kiểm soát được sự biểu hiện gen chuyển Epo ở nguyên bào cơ tải nạp retrovirus cảm ứng với doxycycline sau khi được chuyển vào chuột bình thường cùng gen (Bohl và cộng sự., 1997).

Việc cấy ghép các tổ chức mới (Moullier và cộng sự., 1995) từ nguyên bào sợi tải nạp với gen Epo cDNA dưới sự kiểm soát của promoter phosphoglycerate kinase (PGK) đã cho sự biểu hiện dài hạn (trên 6 tháng) gen chuyển Epo ở chuột bình thường. Mức Epo và

haematocrit phụ thuộc vào số lượng các nguyên bào sợi đã được cải biến gen có mặt ở các tổ chức mới (Naffakh và cộng sự., 1995). Tuy nhiên, khi so sánh với chuột bình thường thì mức tăng haematocrit ở chuột TMVB β cũng chỉ xảy ra trong thời gian rất ngắn.

Vec tơ adenovirus độ chuẩn cao biểu hiện gen chuyển Epo cũng đã được xác định. Nếu không có sự hợp nhất và lại hòa loãng gen chuyển Epo cũng như đáp ứng miễn dịch đối với các tế bào biểu hiện protein adenovirus thì sẽ tiềm ẩn khả năng biểu hiện thấp hoặc biểu hiện nhất thời. Tuy nhiên, sau khi đưa một liều đơn qua tĩnh mạch các hạt vec tơ Epo-adenovirus thì sự tăng hồng cầu được cảm ứng trên 6 tháng ở chuột bình thường (Descamps và cộng sự., 1994). Sự biểu hiện dài hạn của gen chuyển Epo cũng thu được với vec tơ AAV bằng cách tiêm trực tiếp vào cơ chuột bình thường (Danos)

11.5.4 Giảm biểu hiện gen β globin

Trong bệnh TMVB β do thiếu hụt sự tổng hợp chuỗi β globin người ta đều hiểu rõ rằng mức độ nghiêm trọng lâm sàng của TMVB β phụ thuộc vào sự mất cân bằng giữa tổng hợp các chuỗi β globin và các chuỗi không phải là β và đặc biệt hơn là có nhiều chuỗi β hemoglobin tự do (không liên kết với chuỗi α hoặc δ) nên nó không ổn định và bị kết tủa trong hồng cầu và các tế bào tổ tiên.

Những chuỗi β globin không cặp đôi này có chứa nhóm haem và sắt, nó có thể oxy hóa và xúc tác cho sự hình thành các gốc oxy độc tính cao, những gốc này lại cảm ứng sự tiêu máu và làm mất hiệu ứng tạo hồng cầu. Khi tăng các chuỗi β globin của HbF hoặc giảm các chuỗi β (tức là các đồng yếu tố quyết định bệnh TMVB β) thì sẽ làm giảm sự cân bằng chuỗi globin và TMVB β nghiêm trọng. Ngược lại, nếu thêm vào các gen β globin (cặp ba) thường làm tăng tính nghiêm trọng trạng thái dị hợp của TMVB β (Cao và cộng sự., 1995). Nếu giảm 20-30% chuỗi β globin tự do thì sẽ chuyển hội chứng TMVB β nghiêm trọng thành ít nghiêm trọng hơn.

Các chiến lược nhằm giảm số chuỗi β tự do có thể được đặt ra ở các đích khác nhau từ sự phiên mã tới dịch mã sự biểu hiện gen β globin. Ở mức phiên mã, sự biểu hiện gen β globin có thể bị giảm sút là do làm bất hoạt một trong 2 gen β hoặc vị trí HS-40 của LCR gen β bằng cách tái tổ hợp tương đồng *ex vivo* (Bernet và cộng sự., 1995). Cũng có thể sử dụng một “antigene” mã cho RNA tạo nên một xoắn ba để ức chế vị trí hoạt chuyển (HS-40 hoặc promoter gen β). Ở mức sau phiên mã thì một gen kháng RNA “anti-RNA” mã cho RNA antisense (Ponnazhagan và cộng sự., 1994) sẽ ức chế việc xử lý của mRNA của β globin. Cũng có thể hướng một ribozyme hoặc một nuclease H vào việc phân giải đặc hiệu mRNA của β globin hoặc các tổ tiên của nó (Thompson và cộng sự., 1995). Sự phiên mã của antigene hay gen anti- RNA phải đặt dưới sự điều hòa gen globin để phối hợp sự biểu hiện các gen β globin và anti β globin.

11.5.5 Các kiểu GTL khác

Một cách tiếp cận khác ở mức sau phiên dịch là tăng sự ly giải các chuỗi β globin. Hệ thống này có ở hồng cầu lưới của các dị hợp tử TMVB β , không thấy có triệu chứng nào xuất hiện khi 50% chuỗi β bị suy giảm chức năng (vì hầu hết chúng đã bị ly giải). Khi nồng độ chuỗi β globin đã vượt trên một ngưỡng nào đó của TMVB β đồng hợp tử thì quá trình ly giải chuỗi β globin có thể là đã bão hòa, các chuỗi β globin dư thừa sẽ kết tủa và làm

tích tụ haemin và sắt. Có thể cải thiện sự tồn tại của hồng cầu và các tổ tiên của chúng bằng cách cho thêm vào một gen mã cho enzyme protease phân giải đặc hiệu các chuỗi β globin tự do mà không làm biến đổi các protein khác của tế bào.

Các quá trình oxy hóa bất thường mà hậu quả là gây nên sự khiếm khuyết trong TMVB β cũng có thể được giảm bớt hoặc được phòng ngừa bằng cách chuyển vào một gen mã cho một protein có khả năng thu dọn các gốc tự do hoặc gắn vào sắt hoặc haemin tự do được giải phóng ra từ các chuỗi β globin không ổn định đã gây nên sự oxy hóa và làm mất hiệu ứng tạo hồng cầu.

11.6 Điều trị bệnh tế bào liềm

Gen trị liệu soma bệnh tế bào liềm khó hơn bệnh TMVB β , bởi vì gen β^S globin phải được biểu hiện ở mức cao và nhận được chức năng mới đồng thời phải ức chế được quá trình polymer hóa của HbS. Hơn nữa, theo một số chiến lược đã đề cập ở trên thì bệnh tế bào liềm và TMVB β thường có 2 chiến lược đặc hiệu là: (1) chuyển một gen mã cho globin với đặc tính kháng tế bào liềm và (2) chuyển một gen mã cho bisphosphoglycerate mutase để phân giải 2,3-bisphosphoglycerate (Garel và cộng sự., 1994).

Cách tiếp cận trực tiếp và đầu tiên là gây đột biến trực tiếp vị trí codon 22 và 87 của gen β globin để ức chế tiếp xúc trong polymer của hemoglobin như đã thấy ở HbF và HbA (McCun và cộng sự., 1994). Dạng gen chuyển này ổn định và đã được biểu hiện trong các tế bào MEL tải nạp với các vec tơ retrovirus (Takekoshi và cộng sự., 1995). Một cách tiếp cận mới và rất lý thú đối với bệnh tế bào liềm là sửa chữa đột biến bằng thâm chuyển một oligonucleotide chuỗi kép chimeric vào codon 6 trong gen β^S globin (Cole-Straus và cộng sự., 1996).

Một cách tiếp cận gián tiếp đối với GTL đặc hiệu kháng tế bào liềm được suy diễn từ quan sát thấy rằng một biến thể tái tổ hợp của 2,3-bisphosphoglycerate mutase tương hợp acid phosphatase sẽ làm tăng hoạt tính của 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase (Garel và cộng sự., 1994). Khi chuyển gen tái tổ hợp này vào các tế bào hồng cầu sẽ làm giảm mức của 2,3-bisphosphoglycerate *in vitro* và có thể nghĩ tới việc ứng dụng GTL soma *in vivo*.

11.7 Viễn cảnh tương lai

Việc chuyển gen trực tiếp bằng các vec tơ virus có độ thâm nhiễm cao đã tạo được hiệu ứng tải nạp cao cho các cấu trúc ổn định và chúng đã được biểu hiện trong các tế bào tạo máu bình thường *in vitro* cũng như trong các dòng hồng cầu của chuột và người. Điều đó chứng minh cho khả năng tải nạp và biểu hiện của các gen globin *in vivo*. Vì thế người ta có thể thực hiện được các nghiên cứu về tế bào gốc của người tải nạp có hoạt tính khôi phục quần thể dài hạn trong các mô hình TMVB trên động vật. Chuột thiếu hụt miễn dịch (THMD) (Cashman và cộng sự., 1997; Dick và cộng sự., 1995) hoặc chuột bào thai được ghép các tế bào CD34+ và các tế bào đệm có thể được sử dụng để ước tính độ tải nạp và sự biểu hiện của gen chuyển trong tất cả các dòng tế bào từ chính các tế bào gốc nguyên thủy của người *in vivo*. Bằng việc sử dụng các cytokine, tới nay người ta đã kích thích được sự nhân lên *ex vivo* của các tế bào gốc nguyên thủy và tránh được việc sử dụng các chất hóa học hoặc tia xạ toàn thân trước khi ghép các tế bào gốc vào các bệnh nhân có liên quan tới hemoglobin.

Một vấn đề lớn vẫn chưa được giải quyết đó là việc duy trì sự biểu hiện ở mức cao gen chuyển β globin *in vivo*. Người ta đã chứng minh rằng các trình tự của retrovirus cũng ức chế sự biểu hiện gen β globin ở trứng chuột đã thụ tinh sau khi chuyển đến cấu trúc provirus bằng GTL soma (McCun và Towner., 1994). Hầu hết các nghiên cứu về sự chuyển gen β globin đã thu được kết quả trong nuôi cấy nhưng chưa có kết quả *in vivo*. Có một lý do là các dòng tế bào được sử dụng *in vitro* có mức biểu hiện gen globin nội sinh thấp hơn nhiều nguyên hồng cầu *in vivo*, vì vậy không đạt được tỷ lệ 1:1 giữa sự biểu hiện dài hạn gen globin nội sinh và gen chuyển ở các tế bào MEL hoặc K562.

Trong tương lai người ta sẽ chuyển những đoạn DNA lớn, kể cả toàn bộ hệ gen globin. Điều đó đòi hỏi phải có sự nhân lên *ex vivo* và phải thao tác với các tế bào gốc. Đích của tế bào sẽ được cải tiến bằng cách gắn đặc hiệu các receptor đặc hiệu vào các vec tơ. Các phân tử dung nạp có thể sẽ nâng cao sự chuyển DNA bào chất. Các mô hình AAV có thể được thiết kế cho việc hợp nhất gen globin vào vị trí đặc hiệu AAV của NST.

Tất cả những nghiên cứu hiện nay đang tập trung vào việc sản xuất hệ thống vec tơ virus lý tưởng với hiệu ứng tải nạp cao nhưng không làm hạn chế các vec tơ AAV hay retrovirus. Người ta sẽ sử dụng các NST nhân tạo của người để tránh sự hợp nhất ngẫu nhiên của gen chuyển trong hệ gen của tế bào (Huxley, 1994).

Việc trị liệu gen globin một cách hiệu quả và trực tiếp vẫn còn nhiều khó khăn ở phía trước, vì thế GTL gián tiếp cần được phát triển. Phương pháp này có thể hữu ích đối với những bệnh nhân đã bị suy kiệt do bệnh tật cũng như lờn với các chế độ điều trị “không ngon miệng- unpalatable” đương thời. Những trị liệu gián tiếp này có thể sẽ làm giảm bớt sự bệnh hoạn, chết chóc và các vấn đề về con người, gia đình và xã hội của các bệnh thuộc hemoglobin với những khiếm khuyết di truyền nguy hiểm.

Chương XII

ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐAU CƠ DUCHENNE

12.1 Mở đầu

Bệnh đau cơ Duchenne (Duchenne muscular dystrophy –DMD) là một bệnh thuộc cơ thần kinh nguy hiểm, đặc trưng bởi sự tàn phá cơ tiến triển. Những người bị bệnh này nói chung phải gắn với xe đẩy trước tuổi 12 và hiếm khi sống được đến tuổi 30. DMD là bệnh do thoái hóa alen X và chỉ giới hạn ở đàn ông. Tỷ lệ mắc bệnh DMD là 1/3500 nam sơ sinh và 1/3 trường hợp phát triển rời rạc không có tiền sử gia đình (Emer, 1993). Gốc rễ của bệnh là do sự bất thường trong locus định vị ở cánh tay ngắn của nhiễm sắc thể X mã cho protein đa chức năng có tên là dystrophy. Vì tỷ lệ mắc bệnh này cao và là bệnh rất nghiêm trọng nên việc phát triển GTL hữu hiệu là sự sống còn.

12.2 Các đặc trưng bệnh lý và lâm sàng

DMD xác định rõ ràng là bệnh do NST tương đồng với một phổ rộng về lâm sàng. Những khiếm khuyết của DMD chắc chắn là ở mô cơ và luôn là nghiêm trọng. Mặc dầu bệnh đã có từ khi mới sinh, nhưng những tín hiệu lâm sàng nói chung chỉ là chậm biết đi hoặc các chức năng vận động khác bị suy yếu rõ rệt, cột sống ngang lưng bị uốn ra, dáng đi chân mở rộng khi 3-6 tuổi. Sự đi lại khó khăn dần và tới 12 tuổi thì phải phụ thuộc vào xe đẩy (Emery, 1993). Những người đã có đầy đủ các dấu hiệu lâm sàng thì cơ đã bị co rút, vẹo cột sống (Miller và Hoffman, 1994).

Hệ cơ xương của những người bị bệnh DMD bị tác động ngày càng nghiêm trọng theo thời gian, một số khác còn liên quan tới cả cơ tim và cơ trơn. Những rắc rối về tim cũng thường xuất hiện ở DMD với tỷ lệ trên 80%, nhưng những trục trặc rõ ràng về tim thì chỉ chiếm khoảng 10% số bệnh nhân DMD (Quinlivan và Dubowitz, 1992). Phần lớn bệnh nhân chết lại do sự trục trặc sớm về hô hấp ở tuổi 30, dung tích sống nói chung giảm xuống dưới 1 lít khi 12-14 tuổi (Bushby và Gardener – Medwin, 1993). Những tài liệu về bệnh lý cơ trơn còn rất ít và ý nghĩa lâm sàng của nó cũng đang còn nhiều tranh luận. Sự suy yếu nhận thức không tiến triển vào khoảng 50% số DMD (Bresolin và cộng sự., 1994). Tuy nhiên, những triệu chứng này tương đối nhẹ và biểu hiện rất khác nhau, ảnh hưởng chính là tới chỉ số IQ và ký ức ngắn hạn, nhưng không có hệ số thống kê ý nghĩa giữa các dẫn liệu di truyền và các đánh giá tâm lý trắc học (Bresolin và cộng sự., 1994).

Bệnh đau cơ Becker (Becker muscular dystrophy –BMD) là dạng alen nhẹ hơn của DMD, nó cũng có những dấu hiệu lâm sàng tương tự như DMD nhưng xuất hiện chậm hơn (Bushby và Gardener – Medwin, 1993). Kiểu hình lâm sàng của BMD cũng hỗn tạp hơn DMD rất nhiều về các mặt tuổi tác, tỷ lệ tiến triển của bệnh và mức độ nghiêm trọng (Vainzof và

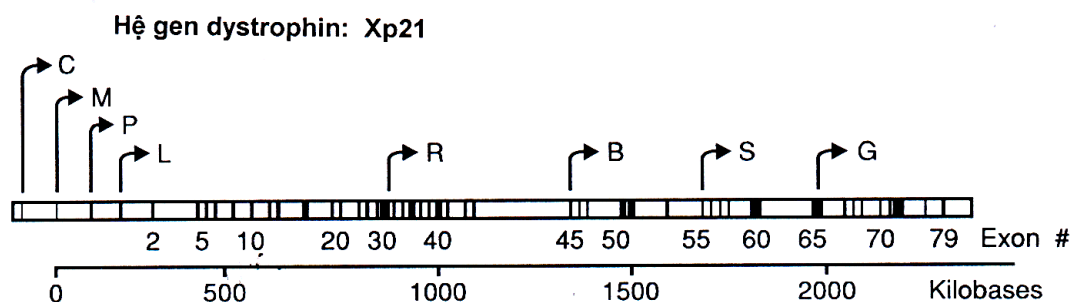
cộng sự., 1993). Hiệu ứng di truyền nói chung ít nghiêm trọng hơn ở DMD và một số bệnh nhân không hề mất khả năng đi lại (Emery, 1993).

12.3 Gen dystrophin và các sản phẩm của nó

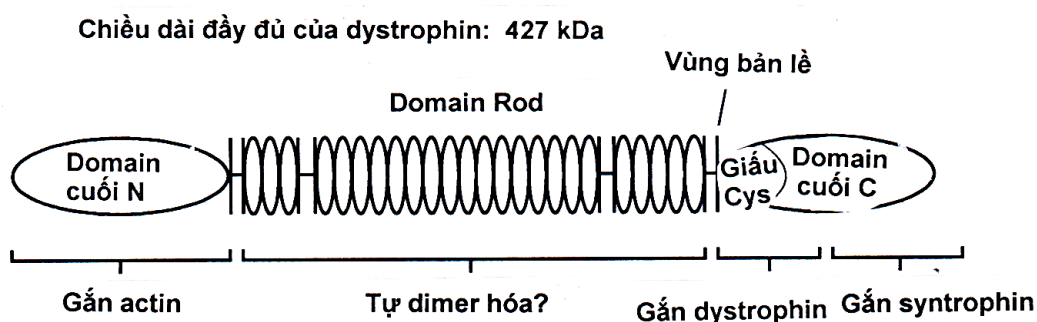
Từ đầu những năm 1980 những hiểu biết của chúng ta về bệnh lý và chức năng của bệnh này đã có những tiến bộ rất đáng kể, khởi đầu là việc xác định chính xác locus DMD ở cánh tay ngắn của NST Xp 21 (Dvies và cộng sự., 1983). Tới nay nó được biết như là một gen lớn nhất với 2400kb, gồm 79 exon và 99,4% cấu trúc gen là intron. Gen lớn này mã cho bản phiên mã mRNA 14 kb với nhiệm vụ kiểm soát sự ghép nối và phiên mã một cách tinh tế, phiên dịch (tổng hợp) một protein 427 kDa có tên là dystrophin (Brown và Dickson, 1994).

Trình tự amino acid của dystrophin chỉ có 4 domain cấu trúc phân biệt (Hình 12.3). Domain cuối N bao gồm 240 amino acid đầu tiên, tương đồng trình tự cao với domain gắn actin của α -actinin và α -spectrin và rõ ràng là gắn vào các trình tự đặc hiệu của F-actin trong phương thức điều hòa phụ thuộc calci (Winder và Kendric – Jones, 1995). Domain mảnh ở trung tâm có 24 đoạn lặp tương đồng, trung bình có 109 amino acid cũng tương đồng cao với α -actinin và α -spectrin. Cấu trúc này theo dự đoán là làm thúc đẩy tương tác xoắn α để có cấu trúc giống hình que dài 100- 125 nm, tạo thuận lợi cho sự kết hợp (Blake và cộng sự., 1995). Tính linh hoạt giống như bản lề trên phân tử là do có mặt 4 vùng giàu proline nằm rải rác dọc chiều dài của que này (Blake và cộng sự., 1994). Các domain giàu cystine với 3080 -3360 gốc gồm 2 mô tip gắn calci có ở calmodulin cũng như ở α -actinin và α -spectrin, mặc dầu khả năng gắn calci thực sự của nó vẫn còn đang tranh cãi (Ahn và kunkel, 1993). Cuối cùng là, domain cuối C gồm 240 amino acid là đặc hiệu đối với họ dystrophin mà chủ yếu là dystrophin và nhiều protein có liên quan tới dystrophin như protein utrophin (DRP1), DRP2, Torpedo 87 (Roberts và cộng sự., 1996) và dystrobrevin (Blake và cộng sự., 1996).

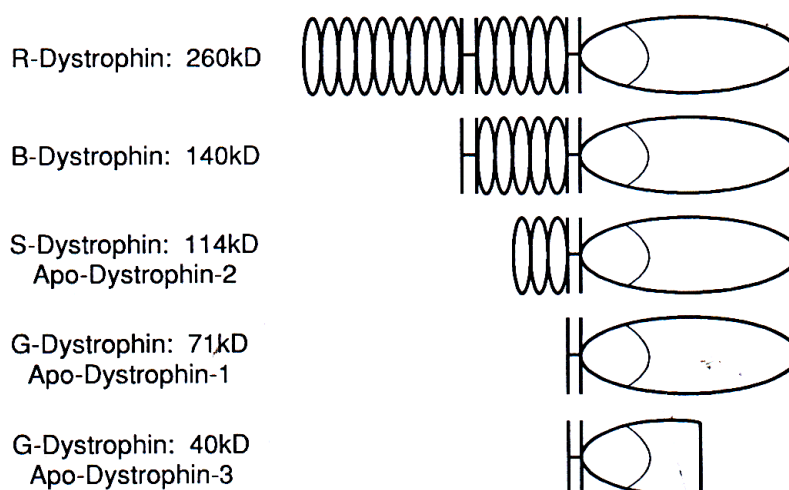
Tới nay 8 promoter độc lập đã được sáng tỏ nhờ việc kiểm soát phiên mã ở locus DMD bằng những phương pháp đặc hiệu tế bào (Matsuo, 1996). Bốn trong số các promoter này khởi đầu phiên mã cho một bản phiên mã mRNA có độ dài đầy đủ, khác nhau ít nhất là exon đầu tiên khi mã cho các protein 427 kDa, protein I (lymphoblastoid), protein C (cortical) và protein dystrophin P (Purkinje) với tất cả 4 domain cấu trúc. Các promoter bổ sung S (Schawann) và G (glial) kiểm soát sự biểu hiện của protein apo – dystrophin cuối C ngắn. Promoter S phiên mã cho một bản phiên mã mRNA 5,6 kb mã cho protein 116 kDa có tên là Dp 116 hoặc apo – dystrophin – 2, chỉ biểu hiện ở hệ thần kinh ngoại biên của người trưởng thành (Blake và cộng sự., 1995). Promoter G phiên mã cho ít nhất 2 bản phiên mã mRNA 4,8 và 2,2 kb có tên là apo – dystrophin – 1 và apo – dystrophin – 3, chúng có các mẫu biểu hiện đồng nhất và dư thừa trong não bộ và các mô không phải là mô cơ, nhưng không phát hiện được ở mô cơ xương đã biệt hóa hoàn toàn (Tinsley và cộng sự., 1994). Gần đây 2 bản phiên mã dystrophin bổ sung 260 kDa (Piller và cộng sự., 1993) và 140 kDa (Lodov và cộng sự., 1995) đã được sáng tỏ, nó khởi đầu từ các promoter R mới (Retina) và B (brain, CNS). Tuy nhiên, tính phức tạp của sự kiểm soát phiên mã gen dystrophin và sự ghép nối của mRNA thì vượt rất xa những protein khung tế bào đã biết và có thể còn có những bản phiên mã nhỏ khác nữa cũng đang tồn tại.



(A)



(B)



Hình 12.1 (A) Sơ đồ gen dystrophin chỉ vị trí gần đúng của 79 exon và 8 promoter đồng nhất. (B) Sự tổ chức các domain giả định của sản phẩm gen dystrophin chính và tổ chức domain dự đoán của các bản phiên mã protein nhỏ hơn; các domain cuối N của các protein đã cắt xén có chứa các trình tự độc quyền ngắn không có trong cuối N của bản phiên mã có độ dài đầy đủ.

(Theo Stephen Murphy, George Dickson. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

Sự biểu hiện của DMD và BMD cho tới nay đều do đột biến ở gen mã cho dystrophin. Tỷ lệ đột biến vào khoảng $790 - 100 \times 10^{-6}$ gen/ thế hệ, tỷ lệ này cao hơn rất nhiều so với các bệnh di truyền khác (Emery, 1993). Sự tác động đặc biệt cao và với phạm vi rộng của các đột biến có liên quan tới locus gen DMD.

Tuy nhiên, nhiều điểm trong gen dystrophin có tỷ lệ đột biến cao nên rõ ràng nó là đích đặc hiệu cho việc gây đột biến (Brown và Dickson, 1994). Trong nhiều trường hợp, sự nghiêm trọng lâm sàng của kiểu hình này có thể có liên quan tới bản chất của sự loại bỏ phân tử (Monaco và cộng sự., 1988). Kiểu hình DMD nói chung là do đột biến làm phá vỡ khung đọc rồi dẫn đến tạo sản phẩm gen không có chức năng và kiểu hình thiếu hụt chức năng một cách nghiêm trọng. Tuy nhiên, kiểu hình BMD nói chung cũng do sự đột biến/ hoặc sự loại bỏ nhưng vẫn duy trì được bộ khung đọc do đó tạo nên các sản phẩm protein bất thường, tuy có bị biến đổi về cấu trúc nhưng vẫn còn giữ được một vài chức năng, kiểu hình này luôn luôn phụ thuộc vào quá trình đột biến (Bushby và cộng sự., 1992).

12.4 Sự định vị và chức năng của dystrophin

Dystrophin được chứng minh là thành phần chính của các sợi cơ bình thường, nó định vị ở màng bao cơ với mức đầy đủ ngay khi thai đang phát triển (Arahata và cộng sự., 1988). Ngay từ giai đoạn sớm của sự tạo cơ, những nguyên bào cơ chưa biệt hóa bình thường đã có một lượng dystrophin. Sự xuất hiện của dystrophin trùng với việc hòa lẫn một cách tự động các tế bào tạo cơ đơn nhân để hình thành một hợp bào đa nhân sau gián phân (Miranda và cộng sự., 1988). Tuy nhiên, trong cơ dystrophic thì không có hoặc thiếu hụt nhiều dystrophin, sở dĩ như vậy là do khi các sợi cơ được tái tạo, thoái hóa hoặc hoại tử thì kích cỡ sợi sẽ bị biến đổi (Miranda và cộng sự., 1988). Sự vắng mặt của dystrophin không làm chết tức thời các tế bào của tất cả các sợi cơ trong DMD và BMD, các chức năng của chúng vẫn được duy trì trong các quá trình tiến triển của bệnh. Tuy nhiên, sự tái sinh của các sợi cơ bị hủy hoại không bù đắp được mức độ thoái hóa sợi cơ ngày càng tăng và tai hại hơn là có thể dẫn tới sự hóa xơ ở các vị trí bị tác động nghiêm trọng dẫn đến bất ổn định các sợi cơ (Miller và Hoffman, 1994).

Mặc dầu đã có sự so sánh biểu hiện của dystrophin ở cơ trơn, cơ tim và cơ xương đã biệt hóa (Chevron và cộng sự., 1994), nhưng khi vắng mặt dystrophin thì hiệu ứng kiểu hình trên lâm sàng ở mỗi mô lại khác nhau. Hiệu ứng của sự thiếu hụt dystrophin trên một mô đặc biệt có liên quan tới mức độ gắng sức của các tế bào cơ (Csinter và Levin, 1993). Khi xem xét về các đặc tính sinh lý và hình thái của cơ thì thấy các tế bào cơ xương có nhiều nhân và dài, lực chỉ được tạo ra dọc trục chính. Tuy nhiên, với các tế bào cơ trơn thì chỉ có một nhân và phân nhánh, lực tạo ra xuyên tâm hơn và bị tác động ít nghiêm trọng hơn cơ xương. Với hình dạng thẳng đứng của cơ trơn, thậm chí với sự liên kết ngẫu nhiên hơn cùng với mạng lưới liên kết rộng nên về mặt lâm sàng thì đó là mô bị tác động ít nhất. Giả thuyết này đã chỉ rõ chức năng của dystrophin là tiếp thêm lực cho màng bao cơ kháng lại lực tạo ra dọc trục trên các tế bào cơ và làm ổn định màng với các chu kỳ lặp lại của sự co cơ (Pasternak và cộng sự., 1995).

Các nghiên cứu trên hiển vi điện tử đã xác định được rằng dystrophin định vị ở dưới màng cơ tim, gắn chặt vào một phức hợp oligomeric với nhiều protein gắn dystrophin (dystrophin – associated protein – DAP) và các glycoprotein gắn dystrophin (DAG) (hình 12.2). Domain giàu cystine và phân nửa đầu tiên của đầu tận C có lẽ là neo dystrophin vào

mặt sau màng cơ tim thông qua sự tương tác với một glycoprotein vận chuyển màng là α - dystroglycan. DAG 43 kDa này là trung tâm của phức hợp và tạo sự liên kết với phần nền (matrix) ngoại bào qua liên kết α - dystroglycan, đó là một DAG ngoại bào 156 kDa gắn với merosin - một dạng tương tự như cơ của laminin (Tinsley và cộng sự., 1994). Ít nhất là có 5 DAG vận chuyển màng liên kết xa hơn với α - dystroglycan mà các dạng phức hợp sarcoglycan có tên là β , γ , δ , ϵ và một DAP 25 kDa chưa được phân loại cùng với các protein chưa được xác định khác nữa (Beckman, 1996). Cuối cùng, một phức hợp tương bào trong đó dystrophin được liên kết qua nửa C tận cùng sau của carboxy tới α (cơ), β_1 -(ubiquitous) hoặc β_2 (các khớp nối cơ thần kinh - neuromuscular junctions - NMJ) syntrophin (59 kDa DAP) (Yang và cộng sự., 1995) cũng như tới một DAP, A₀ 94 kDa (Tinsley và cộng sự., 1994) và có thể với các phân tử tín hiệu tương bào khác bao gồm cả synthase của oxyde nitric (nitric oxyde synthase - NOS) (Brenman và cộng sự., 1995). Khi xem xét về sự liên kết đầu tận N của dystrophin với thành phần F- actin chất nền nội bào thì thấy toàn bộ bộ khung của màng có thể tạo một liên kết giữa các protein co rút trong chất nền sợi cơ nội bào và mô liên kết ngoại bào của phiến cơ bản (Tinsley và cộng sự., 1994). Vì vậy, nếu vắng mặt bất cứ liên kết nào trong chuỗi tương tác từ bộ khung tế bào actin thông qua dystrophin và DAGC tới chất nền ngoại bào thì đều làm giảm tính hợp nhất và tính linh hoạt của màng cơ vân. Thực chất là sự thoái hóa của dystrophin với kiểu hình DMD có liên quan với sự thiếu hụt sơ cấp của hầu hết các thành phần của DAGC (Bảng 12.1).

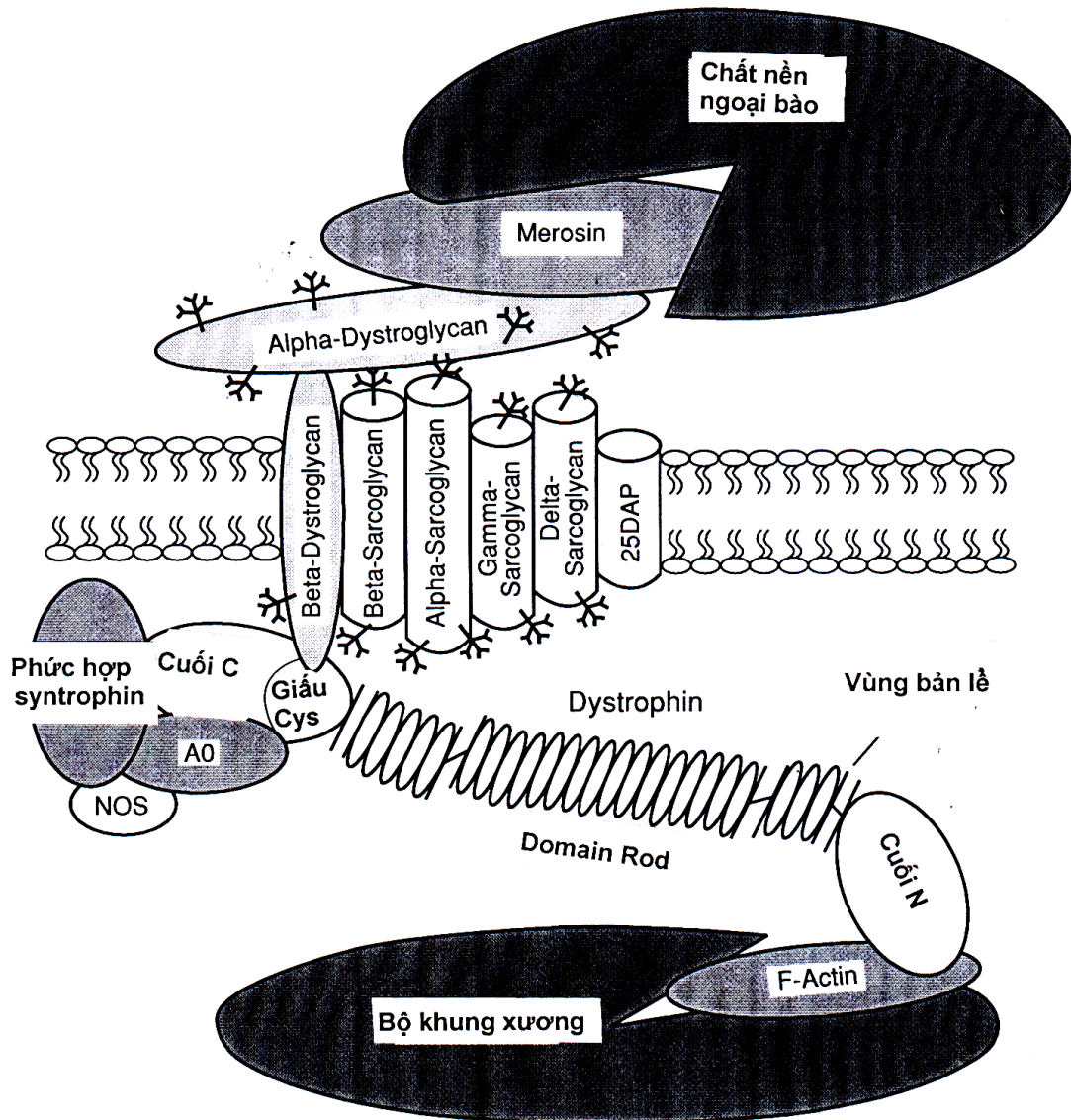
Bảng 12.1 Các thành phần của dystrophin có liên kết với phức hợp glycoprotein

Định vị	Thành phần DAGC	Kích cỡ (kDa)	Locus	Tên khác	Các bệnh liên quan
Vận chuyển màng ngoại tế bào	α -dystroglycan	156	3p21	156 DAG	----
	β - dystroglycan	43	3p21	A3a,43DAG	----
	β - sarcoglycan	50	17q	A2,50DAG, Adhalin	LGMD2D
	β - sarcoglycan	43	4q	A3b, 43DAG	LGMD2E
	β - sarcoglycan	35	13q	A4,35DAG	LGMD2C
	β - sarcoglycan	35	5q	---	LGMD2F
	25 DAP	25	---	A5	-----
Tương bào	dystrophin	427	Xp21	---	DMD/BMD
	β -syntrophin	59	20q11	β -A1	----
	β_1 - syntrophin	59	16	β_1 -A1	----
	β_2 -syntrophin	59	8q23-24	β_2 -A1	----
	A0	94	---	---	----
Phần nền ngoại bào	merosin	400	6q22-23	laminin- α 2-chain	CMD

Ghi chú: Các bệnh có liên quan tới sự vắng mặt các thành phần đặc hiệu của phức hợp: LGMD (dystrophin cơ cánh tay), CMD (dystrophy cơ bẩm sinh).

Sự xuất hiện các kẽ hở ở sợi cơ là hệ quả sơ cấp của sự thiếu hụt dystrophin cùng với việc gia tăng tích tụ calci nội bào ở các sợi cơ của bệnh nhân DMD đã có ngay từ lúc mới

sinh. Mức calci nội bào cao là điềm báo trước của hoại tử tế bào cơ ở những bệnh nhân DMD (Fong và cộng sự., 1990). Cơ của những người được luyện tập bình thường thì sự xâm phạm nhất thời của màng sợi cơ có lẽ là cảm ứng làm tăng creatine kinase huyết thanh (serum creatine kinase – SCK) và sự phì đại cơ sau này như là một cơ chế sửa chữa vết thương tự nhiên. Tuy nhiên, ở cơ dystrophin thì những xâm phạm nhất thời là hệ quả của sự khiếm khuyết hóa sinh có thể dẫn tới xơ hóa và mất dần cơ (Gaschen và cộng sự., 1992).



Hình 12.2 Sơ đồ đại diện của dystrophin liên kết với phức hợp glycoprotein (DAGC) định vị ở màng bao cơ của tất cả các tế bào cơ bình thường, lưu ý các cấu trúc liên kết giữa khung tế bào nội bào và phần nền ngoại bào.

(Theo Stephen Murphy, George Dickson. *Gene Therapy Technologies, Applications and regulations*. John Wiley & Sons Ltd 1999).

Dystrophin biểu lộ ở mô não thấp hơn mô cơ, nhưng lại tích tụ cao ở não, ở chân hải mã (hippocampus - chỗ thông ở sàn não thất bên) và ở vỏ não và cũng có thể phát hiện dễ dàng ở hạch cơ bản và gốc não. Vì chân hải mã và vỏ não phụ trách trực tiếp về cảm xúc, trí nhớ và các quá trình nhận thức nên nó liên quan trực tiếp tới sự chậm trễ tâm thần của DMD (Bresolin và cộng sự., 1994). Khi xem xét về tăng biểu hiện các protein apo - dystrophin cuối C ngắn hơn ở mô não người ta thấy chúng có thể có chức năng trong quá trình nhận thức khá đa dạng giống như chức năng của dystrophin có độ dài đầy đủ ở cơ (Blake và cộng sự., 1994). Tuy nhiên, Bresolin và cộng sự đã chứng minh rằng ở những bệnh nhân DMD thì có sự chuyển hóa thấp ở não và những suy yếu về nhận thức ở DMD là hiệu ứng sơ cấp hay thứ cấp thì vẫn chưa được xác định.

12.5 Các hệ thống mô hình của DMD

Sự tương đồng về di truyền và hóa sinh của DMD quan sát thấy ở chuột, chó và mèo cho thấy nếu các sợi cơ xương không có dystrophin thì sẽ bị hoại tử và thoái hóa một cách tự phát. Mô hình tốt nhất được thiết lập là chuột mdx (Bulfield và cộng sự., 1984), có chứa một đột biến điểm vô nghĩa trong gen dystrophin (Sicinski và cộng sự., 1989). Đặc trưng kiểu hình của bệnh là đột nhiên có sự hoại tử các cơ sau khi sinh 2-3 tuần lễ với các tổn thương giống như bệnh lý học của DMD giai đoạn sớm. Mặc dầu là pha sớm của sự yếu cơ thoáng qua, nhưng những động vật này chưa có sự nghi ngờ gì về lâm sàng cho tới khi ngoài 18 tháng và ngược với DMD ở người. Các cơ chuột lại phát triển to hơn và khỏe hơn bình thường tức là vẫn khỏe mạnh và hoạt bát như bình thường (Cuolton và cộng sự., 1988). Điều đó có lẽ là do sự tái tạo lại hiệu lực của cơ vượt mức cần bù đắp trạng thái thoái hóa, làm mất xơ hóa, giảm hoại tử cơ ở chuột già (Carnwath và Shotter, 1987). Tuy nhiên, cơ hoành chuột mdx cũng như các cơ khác lại thể hiện mô tip (motif) của sự thoái hóa, xơ hóa và khiếm khuyết nghiêm trọng về chức năng khi so sánh với cơ tay của bệnh nhân DMD, điều này giúp ích rất nhiều cho các test trị liệu (Stedman và cộng sự., 1991).

Dystrophy gắn với nhiễm sắc thể X của mèo giống với mdx hơn là DMD (Gaschen và cộng sự., 1992), trong khi đó dystrophin gắn với nhiễm sắc thể X của chó (canine X - linked muscular dystrophy - CXMD) hoặc chó mdx liên quan tới sự hoại tử và thoái hóa cơ và các dấu hiệu xơ hóa vỏ nội cơ (endomysial) và màng trong cơ (perimysial), hầu hết lại đồng nhất với những dấu hiệu xảy ra ở những bệnh nhân DMD (Valentine và Cooper, 1991). Tuy nhiên, trong các thí nghiệm người ta thấy với thời gian phát sinh tương đối dài trong các mô hình trên chó và một số động vật như vậy sẽ tốn rất nhiều thời gian theo dõi và tiền của, vì thế mà hầu hết các nghiên cứu đều hướng vào chuột mdx và chắc chắn rằng những kiến thức của chúng ta về DMD sẽ ngày càng được mở rộng hơn.

12.6 Những cách tiếp cận đối với việc điều trị bệnh DMD

Một trong những đích của phòng ngừa bệnh này là quan tâm tới những tác động mạnh của DMD, sự gian khổ của người bệnh và sự di truyền bởi các vật mang dị hợp là những phụ nữ khỏe mạnh. Chỉ khoảng 5-10% vật mang biểu lộ yếu cơ do những biến đổi cá thể bất hoạt ngẫu nhiên nhiễm sắc thể X (Bonilla và cộng sự., 1988), test đơn đáng tin cậy

nhất đối với vật mang khỏe mạnh là duy trì được mức SCK. Tuy nhiên, các phương pháp mới lại tập trung vào việc xác định đột biến (Bonilla và cộng sự., 1988).

Trong những năm gần đây DMD có sự giảm nhẹ phần nào chủ yếu là do tác động khuyến khích về di truyền, các test phát hiện vật mang và xác định giới tính thai nhi trước sinh (Emery, 1993). Tuy nhiên, vì 1/3 trường hợp là do tự đột biến nên để trị liệu hiệu quả thì cần phải bổ sung thêm các kỹ thuật chẩn đoán cấp.

Có khả năng các cDNA peptide dystrophin tái tổ hợp sẽ cho phép sự chuyển gen soma như là cách trị liệu thiếu hụt dystrophin (Dickson và cộng sự., 1991). Trong việc thiết lập hiệu ứng sinh lý học khôi phục biểu hiện gen dystrophin và liên kết giữa các phần nền nội và ngoại bào thì chuột chuyển gen thật sự là vô giá. Đã có những thông báo về việc hiệu chỉnh hoàn toàn các triệu chứng hóa tổ chức miễn dịch và hình thái học của dystrophin cơ ở chuột chuyển gen mdx. Chúng biểu hiện được cDNA dystrophin có độ dài đủ cùng với việc khôi phục DAGC và sau đó khôi phục chức năng bình thường của cơ (Wells và cộng sự., 1995). Hơn nữa, sự biểu hiện quá mức dystrophin trong cơ xương và cơ tim lại không có liên quan gì với các hiệu ứng phụ cần phải loại bỏ, điều đó đã chỉ rõ rằng việc kiểm soát chặt chẽ sự biểu hiện quá mức của dystrophin có lẽ là không cần thiết (Cox và cộng sự., 1993). Sự hồi phục chức năng bình thường của cơ dựa trên sự thay thế gen với các cDNA dystrophin tái tổ hợp đã kích lệ sự trị liệu bệnh DMD.

Hiện nay kích cỡ của cDNA dystrophin có độ dài đầy đủ lại vượt hơn giới hạn đóng gói của hầu hết các hệ thống chuyển gen virus. Để giải quyết hạn chế này những nghiên cứu đương thời đã sử dụng cDNA dystrophin tái tổ hợp cải tiến, đặc biệt là cDNA dystrophin 229 kDa (6,3 kb) được phân lập từ một bệnh nhân BMD với kiểu hình cực kỳ nhẹ (England và cộng sự., 1990). Một mini-dystrophin định vị đúng vào vị trí màng bao cơ vẫn duy trì được một phần chức năng mặc dù đã có sự loại bỏ lớn tại domain mảnh ở trung tâm kéo dài từ exon 17 đến exon 48. Chuột chuyển gen mdx neo đậu hợp mini-dystrophin 6,3 kb này đã bộc lộ được kiểu hình, điều đó cho thấy dystrophin tái tổ hợp biến đổi này chức năng rất cao (Nells và cộng sự., 1995).

Khi xem xét về bệnh lý học của DMD, theo lý thuyết để đạt tới mức dystrophin bình thường ở cơ dystrophic là cực kỳ khó khăn. Chúng ta biết rằng chỉ cần biểu hiện được mức 20% gen nội sinh của protein 427 kDa là đã bảo vệ được cơ hoành của mdx, còn với cơ 4 đầu thì mức biểu hiện phải cao hơn đôi chút (Phelps và cộng sự., 1995).

Nếu đem so sánh thì protein mini-dystrophin biểu hiện được > 30% cơ hoành nội sinh là có thể dùng được trong trị liệu (Nells và cộng sự., 1995), điều đó đã chứng minh rằng mặc dầu có sự phục hồi của DAGC với mini-dystrophin 229 kDa nhưng sự liên kết màng là kém ổn định, vì thế muốn đạt đến hiệu ứng trị liệu thì phải nhờ tới dystrophin 427 kDa (Nells và cộng sự., 1995).

12.7 Trị liệu tế bào bệnh DMD: Ghép nguyên bào cơ

Ghép nguyên bào cơ của người khỏe mạnh vào mô dystrophic là nghiên cứu tùy chọn được nhiều người ứng dụng, khởi đầu bằng sự phát hiện là khi các tế bào tiền thân của cơ (muscle precursor cells - mpc) một kiểu hình có thể hòa với các sợi cơ của các kiểu gen khác nhau thì sẽ biểu hiện các gen của vật cho (Watt và cộng sự., 1984). Việc tiêm mpc của chuột hay của người khỏe mạnh vào cơ của mdx đã chứng minh rõ ràng là nó cảm ứng biểu hiện một lượng dystrophin kích cỡ bình thường và định vị đúng vị trí (Patridge và cộng sự., 1989; Vilquin và cộng sự., 1995). Mặc dù có vấn đề miễn dịch đối

với dystrophin, nhưng rõ ràng là đã làm tăng được sự tồn tại của các sợi cơ (Morgan và cộng sự., 1993).

Những kết quả hứa hẹn thu được ở chuột mdx đã khích lệ việc thúc đẩy các thí nghiệm trên người. Tuy nhiên, cho tới nay vẫn chưa thu được kết quả nào vì hiệu ứng tổng thể là cực kỳ thấp và không thấy có những cải thiện thật sự về lâm sàng dài hạn (Mendel và cộng sự., 1995). Sự thiếu hiệu quả của kỹ thuật này do rất nhiều yếu tố khó mà khắc phục được vì nó vượt ra ngoài mô hình trên động vật. Sự thất bại của mpc đối với việc hòa với các sợi cơ không tái sinh đã hạn chế rất lớn cho sự trị liệu và thực tế là người ta quan sát thấy một số mpc đã hợp nhất vào mô cơ đang tăng trưởng, điều đó đã làm rối tung vấn đề là cần phải được trị liệu sớm vì tính chất tiến triển của bệnh (Partridge và cộng sự., 1989). Số lượng và khả năng sống của các nguyên bào cơ được tiêm vào cũng như sự phòng trị cơ và ngay cả quy trình tiêm cũng là những yếu tố quan trọng, tuy vậy vai trò của hệ miễn dịch vẫn nổi trội hơn cả (Vilquin và cộng sự., 1995). Đối với vật chủ thì hệ thống hòa hợp tổ chức chính (major histocompatibility complex –MHC) cũng có thể hòa hợp, dung nạp và cũng có thể có sự ly giải các vi ống (myotubes) do các tế bào T gây độc tế bào dị phản ứng (alloreactive) và các tế bào giết tự nhiên (natural killer) trong những ngày đầu tiên, mặc dầu đã được kim hãm miễn dịch (Roy và cộng sự., 1993).

Việc ghép những tế bào mô cơ cùng nguồn từ bệnh nhân được tải nạp với dystrophin tái tổ hợp sau đó đưa trở lại bệnh nhân đã có những lợi thế vượt hơn sự cấy ghép dị loại do khắc phục được sự thải loại miễn dịch. Tuy nhiên, vì tiềm năng tăng sinh của các tế bào tên lửa bắt nguồn từ cơ dystrophin đã bị cạn kiệt do đó không có đủ số lượng các tế bào chức năng để tiêm truyền. Mặc dầu tiêm mpc đã xuất hiện một vài đặc tính di trú (Morgan và cộng sự., 1993) nhưng tỷ lệ này rất hạn chế. Do tính chất của bệnh rất phức tạp và tính không dễ tiếp nhận của nhiều cơ trong đó có cả cơ tim, cơ hoành nên việc chuyển nguyên bào cơ có thể là không thực tế.

12.8 Gen trị liệu bệnh DMD

Gen trị liệu hiện nay đang nhắm vào việc nâng cao mức biểu hiện của một gen bình thường khi được đưa vào tế bào và nó sẽ có chức năng tạo ra một lượng đủ các sản phẩm gen chuẩn để bù đắp cho các gen vật chủ đã bị đột biến không còn được biểu hiện nữa. Có nhiều chiến lược di truyền nhằm chuyển các bản phiên mã của cấu trúc dystrophin vào các tế bào cơ *ex vivo* và *in vivo*. Mục đích cuối cùng là một gen chuyển được biểu hiện dài hạn và được điều hòa nhờ một phương pháp chuyển gen hiệu quả và an toàn có thể ứng dụng được trong thực tiễn.

12.8.1 Tiêm trực tiếp DNA

Cách trị liệu đơn giản nhất, ít tốn kém nhất và an toàn nhất là đưa trực tiếp DNA vòng hoặc RNA vào một mô mong muốn. Khi tiêm trực tiếp DNA plasmid vào cơ chuột *in vivo* đã cho kết quả chuyển gen ổn định. DNA được tiêm định vị ở phần nhân ngoài NST dưới dạng vòng. Vì bản chất của nó là hậu gián phân và tồn tại lâu dài nên các sợi cơ cho phép biểu hiện ổn định gen chuyển ngay cả ngoài NST (Wolff và cộng sự., 1992).

Tuy nhiên, đã có thông báo rằng nếu chuyển DNA trực tiếp thì sự biểu hiện gen bị biến đổi rất nhiều, chủ yếu là do sự phân phối không đồng đều của các chất được tiêm vào cơ thể. Nếu tiêm sơ bộ một thể tích tương đối lớn dung dịch đường sucrose ưu trương (25%)

thì sẽ làm giảm bớt sự biến đổi này vì áp xuất thủy tĩnh buộc các sợi cơ phải nở ra do đó làm tăng sự phân phối của mẫu cũng như mức độ biểu hiện (Davis và cộng sự., 1993). Tuy nhiên, khi tiêm một thể tích lớn như vậy sẽ gây đau đớn cho người bệnh và làm hủy hoại lớn các cơ, mà điều này lại cần phải được giảm thiểu tới mức thấp nhất (Davis và cộng sự., 1993). Hiệu ứng thâm chuyển cao hơn cũng quan sát thấy ở cơ đang tái sinh được cảm ứng thực nghiệm bằng cách xử lý trước với việc gây tê tại chỗ với bupivacaine (BPVC) (Wells, 1993). Điều này thuận lợi cho GTL đối với DMD vì các sợi cơ tái sinh có rất nhiều trong giai đoạn sớm của bệnh.

Mô cơ đặc biệt thích hợp đối với sự hấp thu và biểu hiện DNA mà đặc biệt là các cơ có sọc (có vân) (Acsadi và cộng sự 1991). Hiệu ứng hấp thu ở chuột được chứng minh là phụ thuộc vào tuổi và giới tính của đối tượng nhận (Wells và Goldspink, 1992), với các tiền thân tế bào cơ đơn nhân thì nó chỉ có hiệu ứng xác định đối với sự tăng trưởng (Davis và cộng sự., 1993). Nếu tiêm mô liên kết sợi (endomysial) vào cơ hoành chuột thì an toàn, sự chuyển gen có hiệu quả với sự hủy hoại cơ thấp nhất có thể so sánh với cơ xương được xử lý trước với sucrose ưu trương hoặc với cảm ứng tái sinh. Có khả năng hơn cả là do mô liên kết sợi cơ ít chặt chẽ hơn cơ xương nên sự khuếch tán dễ dàng hơn (Davis và cộng sự., 1993). Vì cơ hoành của chuột mdx là mô phản chiếu rõ ràng nhất bệnh lý học của DMD (Stedman và cộng sự., 1991) nên sự quan sát này có thể giúp cho việc đánh giá lâm sàng sự tiêm trực tiếp để xử lý sự thiếu hụt dystrophin.

Đối với GTL dystrophin cơ thì một vài nhóm nghiên cứu đã thông báo rằng đã biểu hiện ổn định dystrophin có độ dài đầy đủ giống như Becker trong cơ chuột mdx sau khi tiêm trực tiếp vào cơ chuột các plasmid. Các protein này được định vị chính xác, trùng khoảng 1% số sợi cơ (Acsadi và cộng sự., 1991) và thể hiện chức năng bảo vệ các sợi cơ của mdx khỏi bị thoái hóa (Danko và cộng sự., 1993). Tuy nhiên, vì hiệu ứng này còn thấp và kết quả tái sinh còn nghèo nàn nên việc thăm dò xử lý một tỷ lệ lớn cơ bị tác động trong DMD vẫn còn nhiều vấn đề đặt ra với kỹ thuật này. Có nhiều cơ chế kích thích sự hấp thu DNA, tuy vậy có giả định cho rằng sự phức hợp của DNA trong một môi trường thích hợp đã tạo thuận lợi cho sự hấp thu, chẳng hạn như các polycation (Kawai và Nishizawa, 1984) hoặc các ligand receptor (Wagner và cộng sự., 1992; Wu và cộng sự., 1989). Nhưng sự quan tâm nhất hiện nay lại là việc sử dụng các liposome cationic như là các phương tiện vận chuyển gen tái tổ hợp vào các mô khác nhau *in vitro* cũng như *in vivo* (Alton và cộng sự., 1993). Khi sử dụng các liposome làm phương tiện vận chuyển gen đã thu được hiệu ứng chuyển cDNA dystrophin tới 10% trong nuôi cấy sơ cấp (Trivedi và Dickson, 1995). Tuy nhiên, một nghiên cứu rất gần đây đã chứng minh rằng nếu tiêm plasmid dystrophin vào cơ hoành thì đạt hiệu quả tới mức 15-20% và cải thiện đáng kể về sinh lý học (Decrouy và cộng sự., 1997), điều đó chứng minh rằng sự chuyển gen trực tiếp qua cơ có rất nhiều triển vọng.

12.8.2 Các vec tơ retrovirus

Trong chuyển gen soma, các virus khiếm khuyết sao chép lại cho nhiều lợi thế đối với các kỹ thuật chuyển gen hiện nay. Chúng làm tăng đáng kể hiệu ứng đích và không mã các kháng nguyên virus hoặc gây độc tố tế bào, chúng hợp nhất ổn định và hiệu quả gen chuyển vào trong NST vật chủ và đủ năng lực biểu hiện lâu dài (Miller và cộng sự., 1988). Các retrovirus có thể thâm nhiễm *in vitro* vào các tế bào cơ và khởi đầu cho sự biểu hiện gen chuyển (Smith và cộng sự., 1990). Tuy nhiên, cũng có nhiều chướng ngại lớn làm giới

hạn hiệu ứng của sự chuyển gen retrovirus đối với DMD trong đó có cả việc làm mất khả năng thâm nhiễm các mô hậu gián phân của chúng như mô cơ vì sự hợp nhất của chúng phụ thuộc phân bào có tơ (Miller và cộng sự., 1990).

Do giới hạn về kích cỡ đối với việc cài nên DNA 9-10 kb còn lâu nữa mới có thể được áp dụng. Những nghiên cứu hiện nay đang nhằm vào cDNA mini-dystrophin có chức năng giống Becker 6,3 kb. Người ta đã chứng minh rằng các retrovirus tái tổ hợp có một gen nhỏ (minigen) đúng vị trí gen cấu trúc của retrovirus được đóng gói trong các hạt virus thâm nhiễm và được dùng để thâm nhiễm trong nuôi cấy sơ cấp các nguyên bào cơ của mdx, kết quả là biểu hiện được protein mini-dystrophin ở đúng vị trí màng bao cơ (Dunckley và cộng sự., 1992).

Khi tiêm trực tiếp vào cơ chuột mdx *in vivo* cấu trúc này sau khi sinh 7-8 tuần đã biểu hiện ổn định mini-dystrophin định vị chính xác ở màng bao cơ, trung bình 6% sợi cơ trong 9 tháng cùng với việc xuất hiện lại một DAG 43 kDa là β - dystroglycan (Dunckley và cộng sự., 1993). Nếu tăng hoạt động gián phân của cơ dystrophic tái sinh thì sẽ càng thích hợp cho việc chuyển gen qua trung gian retrovirus *in vivo* với kết quả tăng nhẹ (khoảng 8%) cảm ứng thực nghiệm tái sinh cơ mdx (Dunckley và cộng sự., 1993).

Ở cơ người trưởng thành, hoạt động gián phân của các tế bào tên lửa bị hạn chế, nên retrovirus tái tổ hợp sẽ trợ giúp cho quá trình tái sinh. Tuy nhiên, vì hiệu ứng tải nạp tương đối thấp nên khả năng của các tế bào tên lửa đang phân cũng chia bị hạn chế, cũng như việc can thiệp của hệ miễn dịch đã làm giảm đáng kể thời gian bán sống của retrovirus *in vivo* (Fassati và cộng sự., 1995). Các retrovirus của chuột nhạy cảm với sự ly giải qua trung gian bổ thể người (Welsh và cộng sự., 1975). Những nghiên cứu hiện nay đang khắc phục điều đó bằng cách cải biến glycoprotein lớp vỏ để tạo ra retrovirus giả kháng lại bổ thể (Takeuchi và cộng sự., 1994), hoặc làm biến đổi quyết liệt hơn bằng cách dùng thuốc ức chế bổ thể (Rother và cộng sự., 1995).

Các retrovirus tái tổ hợp hiện nay được thiết lập với các thành phần promoter bên trong để hướng sự biểu hiện gen chuyển, tránh những giới hạn có liên quan với promoter đoạn lặp dài nội sinh (endogenous long terminal repeat (LTR) promoter) (Jahner và cộng sự., 1982). Khi sử dụng các vùng điều hòa đặc hiệu cơ để giới hạn sự biểu hiện của chúng đối với các sợi cơ đã biệt hóa sẽ cho phép kiểm soát bổ sung tính đặc hiệu mô (Ferrari và cộng sự., 1995). Thêm nữa là, việc công nghệ hóa domain protein dị loại trong glycoprotein lớp vỏ và thay đổi tính hướng của chúng sẽ tạo được đích chính xác của retrovirus tái tổ hợp đối với các dạng tế bào đặc hiệu (Kasahara và cộng sự., 1994; Somia và cộng sự., 1995).

Với cách tiếp cận *ex vivo*, gen được chuyển qua trung gian retrovirus vào các nguyên bào cơ nuôi cấy sơ cấp của bệnh nhân *in vitro* rồi ghép lại cho bệnh nhân đã có một số kết quả (Salvatori và cộng sự., 1993), mặc dầu kỹ thuật này vẫn còn những hạn chế nhất định. Một cách tiếp cận khác là tiêm trực tiếp các dòng tế bào tạo retrovirus bất hoạt gián phân vào cơ xương tái sinh đã làm tăng hiệu ứng tải nạp và sự thâm nhiễm của các tế bào tên lửa, góp phần vào việc tạo ra lâu dài các sợi cơ mới (Fassati và cộng sự., 1996).

Nhiều chiến lược *in vivo* tinh xảo để cập trước khi thử nghiệm lâm sàng đối với GTL qua trung gian retrovirus với cơ xương đã được thực hiện. Hơn nữa, bệnh lý học cơ tim lại là nguyên nhân chính gây chết đối với các bệnh nhân DMD vì các tế bào cơ tim không được tái sinh vì thế người ta đang trông đợi vào GTL qua trung gian retrovirus.

12.8.3 Các vec tơ adenovirus

Các vec tơ adenovirus là các ứng cử viên hấp dẫn cho sự chuyển gen tới cơ xương do sự độc lập sao chép của tế bào chủ và khả năng gây bệnh thấp cho người và lại có nhiều vật chủ đồng thời lại có độ chuẩn cao nên nó có tính khả thi lớn trong lâm sàng. Chướng ngại lớn nhất đối với các vec tơ retrovirus hiện nay là những ràng buộc tương đối lớn về kích cỡ của DNA có thể được đóng gói trong các virion (khoảng 105% hệ gen hoang dã) (Bett và cộng sự., 1993). Khả năng cài DNA ngoại lai chỉ hạn chế ở 7,8 kb (Bett và cộng sự., 1994) vì thế không thể điều tiết được cDNA dystrophin có độ dài đầy đủ, do vậy các nghiên cứu hiện nay lại tập trung vào cDNA mini-dystrophin giống Becker 6,3 kb (England và cộng sự., 1990).

Các vec tơ adenovirus tái tổ hợp đã loại bỏ E1/E3 có chứa cDNA dystrophin giống Becker này điều khiển các RSV cấu thành và promoter CMV để chuyển mini-dystrophin vào trong môi trường nuôi cấy (Dickson và cộng sự; Ragot và cộng sự., 1993). Trong các nghiên cứu *in vivo*, khi tiêm vào cơ chuột mdx sơ sinh cấu trúc adenovirus thì thấy có sự tổng hợp một lượng lớn mini-dystrophin định vị chính xác ở màng bao cơ trong 5-50% sợi cơ. Sự biểu hiện rõ ràng sau khi tiêm 6 tháng và không thấy có bằng chứng nào về sự thay đổi tổ chức bệnh học do đáp ứng miễn dịch gây độc tế bào (Vincent và cộng tác., 1993). Ý nghĩa của sự chuyển giao này đã phản ánh vai trò bảo vệ cao của cơ dystrophic đối với stress cơ học (Deconinck và cộng sự., 1996). Các adenovirus tái tổ hợp biểu lộ các gen nghiên cứu dưới sự kiểm soát của các trình tự điều hòa đặc hiệu cơ có sự đặc hiệu mô trực tiếp (Quantin và cộng sự., 1992). Vai trò quan trọng của sự kiểm soát đã được hợp nhất trong các virus mini-dystrophin là định hướng sự biểu hiện loại trừ trong các sợi cơ (Alameddine và cộng sự., 1994).

Sự phân phối là yếu tố chính quyết định hiệu ứng tải nạp đối với các mô khác nhau. Khi theo dõi hệ thống adenovirus tái tổ hợp thì thấy rất nhiều tế bào đã được thâm nhiễm và biểu hiện được gen chuyển (Kass – Eisler và cộng sự., 1994). Đối với GTL qua trung gian adenovirus với dystrophy cơ thì thấy có nhiều sợi dystrophin dương tính ở tim, cơ hoành và cơ liên sườn, nhưng không thấy ở các cơ chân tay (Acsadi và cộng sự., 1996). Vì vậy các chiến lược về đích của phức hợp cũng đòi hỏi phải có sự xử lý cục bộ để lựa chọn các nhóm cơ cũng như sự hấp thu ở tim, cơ hoành và các cơ hô hấp ở màng phổi hoặc trong động mạch. Thêm nữa, tính thâm nhiễm của mô cơ bởi các vec tơ adenovirus lại rất phụ thuộc vào mức độ trưởng thành của mô. Ngay ở độ chuẩn cao, các sợi cơ trưởng thành cũng không có hiệu ứng tải nạp (Acsadi và cộng sự., 1994; Dickson và cộng sự., tài liệu cá nhân). Tuy nhiên, các yếu tố miễn dịch có lẽ vẫn giữ vai trò nổi bật nhất. Người ta đã quan sát thấy có sự tăng đáng kể hiệu ứng cảm ứng tái sinh dư thừa ở chuột trưởng thành (Dickson và cộng sự., tài liệu cá nhân). Ngược với cơ xương, hiệu ứng tải nạp của cơ tim chuột trưởng thành rất giống các quan sát thấy ở chuột sơ sinh (Acsadi và cộng sự., 1995).

Về thời gian biểu hiện gen ngoại lai trực tiếp qua adenovirus thì hiếm khi thấy dài hơn một năm. Đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên của lympho đối với các tế bào đã thâm nhiễm virus, kể cả việc cho thâm vào các tế bào CD4+ và CD8+ cũng có thể có đáp ứng làm giảm sự biểu hiện của gen chuyển và đáp ứng viêm. Tuy nhiên, các đáp ứng của tế bào T dự đoán không phải là một đáp ứng đơn độc mà nó cũng có liên quan tới sự phá hủy không đặc hiệu kháng nguyên phụ thông qua tế bào NK hoặc đại thực bào (Yang và cộng sự., 1995). Thêm nữa là cơ chế thể dịch của việc sản xuất kháng thể trung hòa cũng là trở ngại cho việc sử dụng lặp lại các chế phẩm (Yang và cộng sự., 1995). Sự biểu

hiện gen giảm sút nhiều cũng quan sát thấy khi sử dụng lặp lại adenovirus, nó tương quan ngược với độ chuẩn kháng thể trung hòa (Yei và cộng sự., 1994). Tuy nhiên, người ta đã dự đoán rằng khi sử dụng lặp lại với các liều thấp thì sẽ được dung nạp, nhưng lại làm giảm mức độ chuyển gen (Bout và cộng sự., 1994). Mặc dù chỉ là sai sót chức năng sớm của vùng (E1a/b), nhưng các vec tơ adenovirus thế hệ đầu tiên đã mất sự phiên mã / dịch mã cao các protein virus miễn dịch muộn, khởi đầu cho sự đáp ứng CTL và cuối cùng là làm mất sự biểu hiện gen chuyển (Yang và cộng sự., 1995). Các vec tơ adenovirus thế hệ thứ hai lại tập trung vào việc tránh các can thiệp miễn dịch nên phải loại bỏ một số thành phần (Gorziglia và cộng sự., 1996) hoặc gây đột biến nhạy cảm nhiệt ở gen E2a (Yang và cộng sự., 1994) nên đã làm bất hoạt promoter chủ chốt muộn bởi có sự tái hợp nhất các gen kiểm chế miễn dịch, tức là gp19 vùng E3 (Poller và cộng sự., 1996).

Mặc dầu protein mini-dystrophin giống Becker còn giữ được một số chức năng, nhưng sự vận chuyển của nó vẫn chỉ tạo được một phần kiểu hình giống Becker ở đối tượng nhận. Những nghiên cứu hiện nay đang tập trung vào việc phát triển các vec tơ adenovirus trình tự ngắn, trong đó tất cả các gen cấu trúc đều bị loại bỏ nhưng chỉ là các trình tự cần thiết cho sự sao chép trực tiếp hệ gen và sự đóng gói. Những vec tơ như thế sẽ có khả năng cài được tới 37 kb và vì không có các gen cấu trúc của virus nên dường như tránh được cả đáp ứng miễn dịch thứ cấp. Các cấu trúc adenovirus giả có chứa hộp cDNA dystrophin có độ dài đủ (Dickson và cộng sự., 1991) hiện nay có thể gắn được vào capsid adenovirus thâm nhiễm bằng cách dùng virus trợ giúp để cung cấp các gen cấu trúc *in trans* và hướng được sự biểu hiện dystrophin có độ dài đủ *in vitro* và *in vivo* (Hacker và cộng sự., 1996; Murphy và cộng sự., tài liệu cá nhân). Tuy nhiên, các đáp ứng miễn dịch với các virus bất hoạt bằng UV thì đã rõ, các đáp ứng của tế bào B và T giúp đỡ sơ cấp ở đây là nhằm vào các protein của virus (Yang và cộng sự., 1995). Vì thế, những cải tiến trong thiết kế vec tơ làm giảm tối đa sự biểu hiện protein virus sẽ không nhằm vào việc tái phân phối nữa. Việc làm giảm nhẹ tức thì hoặc sự thao tác miễn dịch của vật chủ đối với virus sẽ là cần thiết trong mỗi quá trình xử lý (Lochmullervaf cộng sự., 1996).

12.9 Thay đổi các chiến lược trị liệu

Gần đây có nhiều cách tiếp cận mới với trị liệu phục hồi / phòng ngừa kiểu hình dystrophic đã được xem xét. Oligodeoxynucleotide antisense (ODN) là chất ức chế được sử dụng rộng rãi để biểu hiện gen, nó có khả năng ngăn chặn sự biểu hiện các gen đặc hiệu mà không làm thay đổi sự biểu hiện của các gen khác, kéo theo cả sự liên kết DNA đích bổ sung và sự ngăn trở không gian liên quan với bộ máy biểu hiện gen. Vì thế khi xem xét sự tồn tại của các đốm nóng đột biến cao trong hệ gen dystrophin và chức năng của các dẫn xuất dystrophin bị cắt xén, việc áp dụng ODN gây cảm ứng nhảy qua exon đặc hiệu và ngăn chặn sự liên kết cơ học của exon bị tác động khi hồi phục chức năng khung v.v.. đó là những cách tiếp cận đầy hứa hẹn (Pramono và cộng sự., 1996). Có thể dùng các tế bào tuần hoàn có khả năng trở lại vị trí tổn thương để chuyển các chất trị liệu sớm. Trong DMD đó là các đại thực bào định vị tự nhiên ở các vị trí hoại tử trong cơ dystrophic. Các nghiên cứu bước đầu cho thấy đã đưa được các đại thực bào công nghệ hóa vào các vị trí cơ bị hủy hoại với thời gian 2 tháng (Parrish và cộng sự., 1996).

Một cách tiếp cận khác bổ sung gen dystrophin trong DMD là điều hòa lên sự biểu hiện một DRP tương tự chức năng là utrophin trong cơ dystrophic. Utrophin là một protein rất phổ thông 395 kDa, là tương đồng của dystrophin với 88% trình tự amino acid, có tất

cả 4 domain cấu trúc (Blake và cộng sự., 1995). Utrophin là dạng thay thế của dystrophin rất tương tự về cấu trúc và chức năng, nó được gắn với DAGC liên quan tới biểu hiện dystrophin. Sự biểu hiện của utrophin xảy ra trước dystrophin, khi chỉ còn một vị trí biểu hiện ở NMJ thì sự biểu hiện được thay bằng dystrophin, ở đó nó tương tác với bộ xương tế bào cơ sở actin (Tinsley và cộng sự., 1994). Vì vậy khi xem xét mức độ tương đồng giữa 2 protein này và khả năng của chúng gắn với DAGC thì khả năng là sự thay thế chức năng utrophin-dystrophin trong tất cả các cơ là sự tùy chọn có thể. Một nghiên cứu gần đây về sự chuyển gen utrophin đã được cấy xen vào chuột mdx đã cho kết quả biểu hiện cao ở cơ xương và cơ hoành cùng với giảm đáng kể bệnh lý dystrophic đồng thời hồi phục được DAGC mà không bị mất hiệu ứng (Tinsley và cộng sự., 1996). Tuy nhiên, có khả năng là utrophin ít thích nghi với stress cơ học hơn là dystrophin và sự liên kết với utrophin và dystrophin của F-actin được điều hòa tới các giới hạn khác nhau bởi calcium/calmodulin, vì thế sự biểu hiện vượt mức của utrophin là một trị liệu tiềm năng đối với DMD và BMD (Winder và Kendrick-Jone, 1995).

12.10 Kết luận

Cho tới nay các nghiên cứu thực nghiệm trên chuột mdx đã minh họa khả năng chuyển gen dystrophin tới cơ xương là có hiệu lực, ổn định, biểu hiện dài hạn và trái ngược với nhiều mô hình nghiên cứu trên chuột về bệnh lý học dystrophic. Tuy nhiên, vẫn còn nhiều vấn đề tồn tại trong việc áp dụng kỹ thuật này. Các vấn đề có liên quan trực tiếp tới liều lượng, cách sử dụng, các giới hạn an toàn và hiệu ứng sinh lý học của sự chuyển gen dystrophin cần được sáng tỏ bởi các nghiên cứu trên nhiều mô hình chẳng hạn như trên chó mdx. Hơn nữa, những nghiên cứu cơ bản chính xác về những chức năng bẩm sinh của dystrophin và DAGC cũng như những hiểu biết về sinh học cơ ngày càng tăng lên, chắc chắn chúng ta sẽ tạo được nhiều cấu trúc cho gen trị liệu tương lai. Điều tất yếu là còn rất nhiều trở ngại mà GTL với DMD phải đối mặt như tính ổn định của vec tơ, hiệu lực, mức độ biểu hiện và các hàng rào miễn dịch, đồng thời phải tạo ra được các công cụ theo đúng những suy nghĩ của chúng ta để trị liệu hiệu quả trên lâm sàng. Ngoài việc áp dụng trong DMD cũng còn nhiều vấn đề về dystrophin cần phải tháo gỡ và cần phải có sự trợ giúp rất lớn về các tri thức sinh học và tế bào trong việc trị liệu dystrophy cơ cũng như các bệnh khác mà hiện nay vẫn chưa chữa trị được.

Chương XIII

ĐIỀU TRỊ NHỮNG BỆNH LIÊN QUAN TỚI LYSOSOME

13.1 Mở đầu

Các bệnh liên quan tới lysosome (lysosomal storage disorders – LSD) là một nhóm các bệnh biểu hiện ở mức lâm sàng cũng như tế bào. Có khoảng 50 bệnh được đặc trưng bởi mất khả năng thủy phân của enzyme trong lysosome trong việc phân giải các đại phân tử thành các sản phẩm nhỏ hơn hoặc không vận chuyển được những sản phẩm này vào trong tế bào chất. Sự tích trữ lũy tiến của các chất đã bị phân giải hoặc được phân giải một phần làm cho lysosome bị sưng phồng, biến dạng về giải phẫu và cuối cùng là suy giảm chức năng ở các tế bào bị tác động. Các vấn đề lâm sàng nổi lên bao gồm những bất thường nghiêm trọng của xương như gù vẹo cột sống, mất ổn định đốt đốt trực, mucopolysaccharidose và suy kiệt một số mucopolysaccharidose trong loạn dưỡng chất trắng não và những trục trặc ở tủy xương trong hầu hết các bệnh LSD thường gặp như bệnh Gaucher chẳng hạn (Bảng 13.1)

Bảng 13.1 Tóm tắt các đặc trưng lâm sàng và các LSD được đề cập

Mucopolysaccharidose

Một nhóm gồm 11 bệnh do mất khả năng phân giải của lysosome đối với chất kháng đông glycosaminoglycan, dermatan và chondroitin sulfate MPS-IH (hội chứng Hurler)

MPS-IS (hội chứng Hurler / hội chứng Scheie) MPS IS (Scheie)
MPS-IS (hội chứng Scheie)
MPS –II (hội chứng Hunter)
MPS-III A-D (hội chứng Sanfilippo)
MPS-IV A&B (hội chứng Morquio)
MPS-VI (hội chứng Maroteaux-lamy)
MPS-VII (hội chứng Sly)
MPS-VIII (Keratan và Heparan sulfaria)

Thoái hóa sinh dưỡng mạnh mẽ đầu
MPS –II liên kết với nhiễm sắc thể X
Thay đổi rộng trong kiểu hình nhưng những mô chính bị tác động là xương đặc biệt là xương trục, não bộ (MPS-IH, MPS-II, MPS-III, MPS –VII và MPS –VIII), các mô mềm, gan, lách ghép tủy xương giúp một số dưới nhóm đảm nhiệm được công việc trước khi bị hư hỏng thần kinh

Các bệnh do thoái hóa glycoprotein

6 bệnh do mất khả năng phân giải của lysosome đối với oligosaccharide

□- mannosidosis

□- mannosidosis

Fucosidosis

Sialidosis

Aspartylglucosamine

thiếu hụt carbohydrate

Hội chứng glycoprotein

Tất cả các bệnh thoái hóa sinh dưỡng

Thay đổi lớn gây nghiêm trọng đối với các bệnh thiếu hụt enzyme, nhưng những đặc trưng lâm sàng bao gồm cả chậm phát triển tâm thần tiến triển và xương bất bình thường (□- mannosidosis, fucosidosis, sialidosis), động kinh và liệt tứ chi (□- mannosidosis)

Chưa xác định trị liệu

Bệnh Gaucher

Thủy tổ của một nhóm bệnh di gen do tích tụ trong lysosome chất glycosylceramide. Nguyên nhân chủ yếu là do các đột biến hydrolase acid □-glucosidase, nhưng cũng có đột biến trong chất hoạt hóa protein posaposin

Thoái hóa sinh dưỡng

Thay đổi lớn trong kiểu hình bởi bệnh lý thần kinh. Các mô khác bị tác động là gan, lách, tủy xương và xương. Thay thế enzyme có lợi cho các bệnh không thuộc thần kinh, và cũng có thể ứng dụng việc ghép tủy xương

Bệnh leukodystrophy biến sắc

Bệnh của chuyển hóa myelin đặc trưng bởi tích tụ cerebroside sulfate và dẫn tới bất thường enzyme arylsulfatase A (chủ yếu) hoặc protein chất hoạt hóa, saposin

Cả rối loạn và thoái hóa sinh dưỡng

Thay đổi lớn về tốc độ và tính nghiêm trọng của kiểu hình mà đặc trưng là thoái hóa thần kinh

Ghép tủy xương có thể áp dụng được

Bệnh Krabbe'

Bệnh của sự chuyển hóa myelin do thiếu hụt enzyme cerebrosidase (galactosylceramide □-galactosidase)

Thoái hóa sinh dưỡng gây chết nhanh do tăng sự co cứng, mù và điếc

Chưa được điều trị

Đặc trưng của nhiều LSD là ngay trong bệnh chỉ liên quan với một enzyme thì đã có những biến đổi thật sự theo tuổi tác. Dường như có một nguyên lý chung là bệnh hiện diện ở nhi đồng và thiếu niên thì các triệu chứng tiến triển nhanh và tiên lượng là xấu, còn nếu bệnh phát muộn hơn thì có thể vẫn sống tương đối bình thường. Những đặc trưng lâm sàng này đã xác định được nhiều vấn đề cần phải đối mặt với GTL các bệnh LSD và cần phải tóm lược được những vấn đề cần phải xác định một cách chính xác đối với một bệnh nhân được dự đoán ở một lứa tuổi với những thay đổi bệnh lý cần được điều trị để

phục hồi lại được mức enzyme ở nhiều mô, kể cả hệ thần kinh trung ương (CNS) đối với các bệnh liên quan tới lysosome (LSD) đặc hiệu.

13.2 Xác định quần thể bệnh nhân

Mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình

Thông thường, người ta phải điều tra xem xét các phương pháp điều trị thực nghiệm như GTL với các bệnh nhân mà được dự đoán là ít có kết quả và với những người mà không còn cách lựa chọn nào khác. Có rất nhiều thay đổi về kiểu hình đối với các LSD đơn – đây là một thách thức rất lớn. Trong phạm vi nào đó, vấn đề này được giải quyết rất chậm chạp vì có một mối tương quan giữa kiểu gen và những bất thường về chức năng. Chẳng hạn như bệnh leukodystrophy dị sắc LSD (LSD metachromatic leukodystrophy –MLD) chủ yếu gây bởi thiếu hụt sơ cấp enzyme arylsulfatase A (ARA) và cũng xác định có sự thiếu hụt một protein hoạt hóa ARA là saposin B. Vì ARA rất quan trọng đối với sự thủy phân sulfatide ở cerobroside- 3-sulfate (một thành phần chính của phiến myelin), nên khi hoạt tính enzym này giảm đi sẽ làm tích tụ sphingolipid và làm suy yếu chức năng của các tế bào thần kinh đệm ít gai (oligodendrocytes) cũng như các tế bào Schwann. Nhiều LSD biến đổi với nhịp độ lũy tiến rõ rệt và có 3 kiểu MLD được nhận dạng như sau: kiểu tấn công sớm vào trẻ em (trong những năm đầu của cuộc sống - thường vào cuối thập kỷ đầu tiên) và một kiểu khởi phát ở người lớn vào thập kỷ thứ hai. Những kiểu này đều có các đặc trưng lâm sàng tương tự như liệt tứ chi tiến triển, các tín hiệu thấp và ngoài bó thấp, sa sút trí tuệ, suy giảm ở mức khó phát hiện về vận tốc truyền dẫn thần kinh.

Vì có một số bệnh nhân MLD ở tuổi bị tấn công mà nhịp độ tiến triển về lâm sàng lại liên quan chặt chẽ với kiểu gen nên người ta có thể dự đoán được mức của enzyme chức năng. Mặc dầu gần 40 thể đột biến đã được xác định trong gen ARA, nhưng 2 trong số đó lại chiếm tới 50% số bệnh nhân. Những trường hợp này là do mất vị trí ghép nối của đối tượng cho ở exon 2 và có sự thay thế một amino acid (P426L) nên tạo ra một enzyme không ổn định nhưng lại có chức năng. Tuy nhiên, đồng hợp tử của những thể đột biến và loại trừ ghép nối lại không tạo được enzyme chức năng, dạng này tiến triển sớm và nghiêm trọng như thể bệnh của trẻ em. Nhưng chỉ cần đạt 1-5% mức enzyme bình thường là đã làm cải thiện đáng kể sự tiến triển của bệnh (trong MLD nếu có 1-5% mức enzyme bình thường đã làm tăng 30% hoạt tính phân giải). Hoạt tính enzyme ở mức trung gian thường lại do sự kết hợp của một đột biến vô hiệu lực và một đột biến thứ hai để tạo ra một ARA không ổn định nhưng hoạt hóa. Đối với các đồng hợp tử của các đột biến làm cho enzyme không ổn định, người ta đo được sự thoái hóa sulfatide vào khoảng 50% mức bình thường và biểu lộ MLD bùng phát muộn. Mối tương quan này không phải là một dự đoán tuyệt đối và vẫn còn một số vấn đề vẫn chưa giải thích được về mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình.

Những mối tương quan tương tự giữa kiểu gen và kiểu hình cũng chưa được phơi bày với các LSD khác mà thông thường nhất là mucopolysaccharidosis, thiếu hụt β -L-iduronidase (MPS-I type I của mucopolysaccharidosis; hội chứng Hurler) cũng như sphingolipidosis, hay bệnh Gaucher. Trong các đồng hợp tử của các đột biến vô nghĩa W402X và Q70X thì mất hoàn toàn hoạt tính enzyme và tiến triển sớm ở xương, các mô mềm và các bệnh ở CNS (MPS-IH). Những bệnh nhân này có mức enzyme thấp nhưng vẫn phát hiện được (1-5%) với sự biến đổi lớn về kiểu hình, dĩ nhiên với các bệnh nhân không có vấn đề về CNS

thì các mô mềm ít bị bất thường và vẫn có cuộc sống bình thường (MPS-IS hoặc MPS-IH/S). Nhiều bệnh nhân trong số này là sự pha trộn các đồng hợp tử của các thể đột biến vô hiệu lực W402X. Tháo gỡ vấn đề này là một công việc phức tạp vì đã xác định được có trên 50 đột biến khác nhau ở gen iduronidase và sự đa dạng di truyền cũng có những biến đổi lớn trong kiểu hình lâm sàng. Mặc dầu đã đạt được nhiều tiến bộ trong nhận thức của chúng ta về bản chất của những đột biến, nhưng vẫn còn rất khó khăn trong việc tiên đoán chính xác tính nghiêm trọng của bệnh. Đây là một vấn đề đã được lặp đi lặp lại nhiều lần với LSD, nhưng hy vọng rằng chúng ta sẽ càng hiểu rõ hơn sự tương tác đa hình với các alen đột biến trong các đồng hợp tử và dần dần sẽ đi tới các dự đoán sớm hơn, tin cậy hơn về các khía cạnh lâm sàng của bệnh.

Xét ở mức độ thực tiễn thì một số ít bệnh có một kiểu hình đặc biệt gây nên những hậu quả lâm sàng có thể được dự đoán một cách tin cậy, điều đó đã giúp cho việc xác định chính xác các ứng cử cho GTL. Đó là đồng hợp tử của W407X và Q70X trong MP-IH, N307S với type I của bệnh Gaucher và L44P ở các cá thể thuộc type III bệnh Gaucher.

13.3 Điều trị chuẩn và điều trị “thử nghiệm”

13.3.1 Chăm sóc chu đáo

Vấn đề thứ hai là xác định xem liệu quần thể bệnh nhân này có phải chưa được chữa trị bằng các phương pháp khác hữu hiệu không? Bây giờ chúng ta chỉ xem xét một vấn đề tương đối đơn giản của LSD, với 3 kiểu điều trị: (1) chăm sóc chu đáo, tức là xử lý triệu chứng và duy trì chất lượng cuộc sống cũng như thay thế enzyme, (2) thông qua việc sử dụng lặp lại một enzyme ngoại sinh hoặc (3) thông qua việc ghép các mô có khả năng tiết và chuyển vận enzyme. Tuy nhiên, việc chăm sóc chu đáo có vai trò quan trọng đối với tất cả bệnh nhân được điều trị bằng phương pháp này hay phương pháp khác. Ví dụ như với bệnh Gaucher thì người bệnh có thể bất ngờ bị đau xương, lúc này cần phải hỗ trợ bằng các thuốc giảm đau tốt. Với những bệnh nhân phải dùng thủ thuật cắt bỏ lách để tăng độ thấm của các tổ chức thì việc truyền dịch sẽ làm đỡ mệt mỏi và kiệt sức do thiếu máu trầm trọng. Đối với các bệnh khác như mucopolysaccharidoses thì phải thận trọng với sự bất ổn định của xương sống hoặc nổi các bướu và cần phải can thiệp bằng phẫu thuật khi cần thiết cũng như cần phải có sự trợ giúp về thính giác hoặc thị giác. Tất cả những vấn đề đó sẽ làm kéo dài và nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân.

13.3.2 Thay thế enzyme

Nhiều bệnh liên quan đến lysosome có thêm một viễn cảnh trị liệu là thay thế và chuyển enzyme vào các mô bị tác động hoặc dùng các enzyme ngoại sinh hay cấy ghép mô. Các chiến lược này đi từ quan sát thấy rằng các enzyme lysosome có thể được tiết ra rồi bị cô lập bởi lysosome ở các mô xa và có thể được chuyển cho các tế bào lân cận do tiếp xúc tế bào trực tiếp. Các protein lysosome trước tiên được tổng hợp ở mạng lưới nội chất, sau đó được chuyển vào các bể Golgi theo sau sự phân ra của một peptide tín hiệu và được chuyển tới khoang lysosome và tiền lysosome. Ở thời điểm di chuyển khỏi bộ máy Golgi, các protein được tách riêng ra nhờ sự vận chuyển tức thì để tới các khoang lysosome hoặc tới các rãnh tiết để được giải phóng khỏi tế bào hoặc có thể được hấp thu thông qua tiêu hóa nội bào (endocytosis) trung gian receptor. Cơ chế có tính nguyên

lý của sự hấp thu là sự biểu hiện các receptor mannose – 6- phosphate (M6P- R), mặc dầu cơ còn nhiều receptor khác nữa như receptor mannose và N- acetylglucosamine của đại thực bào và tế bào đơn nhân, hay receptor của acid sialic cũng có thể biểu hiện ở các tế bào thần kinh đệm, asialogalactose – chứa các protein trên các tế bào gan và receptor của các gốc fucose trên nguyên bào sợi. Nhiều nghiên cứu trên động vật đã chỉ rõ rằng M6P-R có khả năng điều hòa biểu hiện cao nhất khi hình thành và phát triển bào thai. Ở thời kỳ sau sinh thì M6P-R giảm nhanh chóng nhưng vẫn duy trì ở mức đủ cao tạo thuận lợi cho endocytosis của enzyme lysosome ở nhiều mô, kể cả các neuron và thần kinh đệm. Trong những điều kiện bình thường, việc tiết và bắt giữ tiếp theo của enzyme không đóng góp đáng kể vào tổng số enzyme lysosome trong các tế bào, mặc dầu đã được chỉ rõ rằng bằng con đường này đã đóng góp 12% tổng số các thành phần bổ sung enzyme lysosome của các nguyên bào sợi người nuôi cấy. Quá trình này đã được khai thác tốt để điều trị bệnh Gaucher – phát sinh do thiếu hụt enzyme glucocerebrosidase thủy phân protein màng glucosylceramide thành glucose và ceramide. Nguồn chính của cơ chất này là màng tế bào của các tế bào tạo máu và là nguyên nhân chính gây bệnh - lysosome bị sưng phồng trong các đại thực bào. Bệnh Gaucher có đầy đủ các đặc trưng lâm sàng đặc hiệu của LSD, gồm cả thể sớm và thể muộn cũng như nhiều kiểu hình. Tuy nhiên, thể thịnh hành nhất của bệnh này là một thể nhẹ hơn (type I, không phải là bệnh thần kinh mạn), liên quan chủ yếu tới hệ thống mạng lưới nội chất và các thành phần phụ của CNS. Các enzyme tự nhiên đã được ứng dụng trong lâm sàng từ cuối những năm 1960 và đầu những năm 1970. Mặc dầu có thể có một số hiệu ứng lâm sàng, nhưng các kết quả lại mâu thuẫn nhau. Các enzyme luôn được cải biến để cho các đại thực bào có sự đặc hiệu đích. Quá trình này đi kèm với sự deglycosyl hóa (deglycosylation) liên tục các enzyme tự nhiên tinh khiết được tách chiết từ rau thai để tạo ra một enzyme cải biến có gốc mannose tận cùng mà đích của chúng là lectin mannose trên màng sinh chất của đại thực bào. Đã thu được những đáp ứng lâm sàng tuyệt vời khi sử dụng glucocerebrosidase cải biến làm thoái lui chứng lách to và tăng các thông số huyết học, điều đó chứng tỏ rằng sự thay thế enzyme đã đem lại những lợi ích lớn lao với những bệnh nhân Gaucher type I. Trên cơ sở những thắng lợi này, các enzyme tái tổ hợp cũng đã được chuẩn bị cho các đánh giá tiền lâm sàng ở nhiều LSD bao gồm MPS-I, MPS-II, MPS-VI và MPS-VII. Hãy bỏ qua những vấn đề logic chẳng hạn như việc cung ứng enzyme và giá thành trị liệu đắt đỏ, những vấn đề chính về mặt lâm sàng là việc mở rộng cách tiếp cận với các LSD khác xuất phát từ các nhận xét sau đây. Trước tiên là hội chứng dạng phổ biến của bệnh Gaucher có thể được kiểm soát bởi enzyme đích trong một hệ đơn. Ngược lại, bệnh lý học ở nhiều mô khác thì sẽ phức tạp hơn, đặc biệt trong các CNS - ở đó có chút ít bằng chứng về hiệu ứng trị liệu với các thể thần kinh của bệnh. Thứ hai là có bằng chứng cho thấy hoạt tính enzyme có ở tất cả các bệnh nhân Gaucher và các bệnh nhân Gaucher đã tải nạp các protein chức năng ngay từ khi hình thành và phát triển bào thai. Một thể nghiêm trọng khác của LSD (nhưng không làm chết người) - những cá thể bị tác động của bệnh trong thời kỳ phát triển thai không có hoạt tính enzyme gốc khi sinh và không tỏ rõ sự dung nạp miễn dịch các enzyme ngoại sinh. Sở dĩ như vậy là do sự thiếu hụt β -L-iduronidase (MPS-I), nếu tiêm enzyme tái tổ hợp vào mô hình chó trưởng thành bất lực thì thấy enzyme ngoại sinh không làm đảo ngược các biến đổi bệnh lý trong CNS, giác mạc, van tim hoặc sụn khớp. Một sự lý giải có thể là tất cả chó bị tác động đều đáp ứng miễn dịch với enzyme được sử dụng với sự lắng đọng các phức hợp miễn dịch ở thận trong những năm đầu của trị liệu. Các vấn đề về phản ứng miễn dịch đối với enzyme sử dụng cũng đã

được đề cập trong mô hình trên mèo MPS-VI (hội chứng Maroteaux – Lammy). Nếu các vấn đề tương tự nổi lên ở các LSD động vật khác cũng như trong các bệnh tương ứng ở người mà sự thay thế enzyme tỏ ra không hiệu ứng thì rõ ràng đó là thể bệnh cực kỳ nghiêm trọng.

13.3.3 Ghép tủy xương

Cách tiếp cận thứ hai trong việc điều trị LSD là cấy ghép các mô có khả năng tiết ra enzyme. Điều này được thực hiện thông qua ghép tủy xương (bone marrow transplant – BMT) với các mảnh ghép phù hợp có sẵn. Gần đây hơn người ta lại dùng các tế bào từ những người cho không có quan hệ huyết thống trong cấy ghép. Một lợi thế của BMT vượt hẳn sự thay thế enzyme ngoại sinh là nó thiết lập vĩnh viễn hoạt tính enzyme với các bệnh bị tác động sơ cấp ở các hệ thống tạo máu như Gaucher type I cũng như các tế bào ngoài khoang tạo máu thông qua việc tiết liên tục và bắt giữ lại enzyme. Lợi thế đặc biệt của BMT là các tế bào lympho và đại thực bào là các đối tượng cho enzyme có hiệu quả thông qua sự tiếp xúc trực tiếp tế bào với các tế bào lân cận. Các tế bào của hệ thống tạo máu có khả năng thấm và đưa enzyme vào tận CNS – ở đó không thể tiếp cận bằng sự truyền enzyme.

Những nghiên cứu khởi đầu ở các mô hình động vật về LSD như mannosidosis, fucosidosis, MPS-VII (hội chứng Sly) và bệnh Krable đã cho những kết quả khích lệ, nó làm nghịch đảo hoặc dừng hẳn các bệnh thần kinh. Những kết quả nghiên cứu trên người thì biến động nhiều hơn. Một công trình đăng trên tạp chí “European allogeneic BMT experience in LSD” đã khẳng định BMT là một phương pháp điều trị tốt bệnh Gaucher không có bệnh lý thần kinh, tất cả 5 bệnh nhân type I được điều trị đã có sự thoái lui về các tín hiệu và triệu chứng lâm sàng. Với các bệnh nhân có bệnh lý CNS thì 6 bệnh nhân MLD không thu được bất kỳ lợi thế nào từ sự cấy ghép. Tuy nhiên bệnh lại được ổn định ở các trường hợp mucopolysaccharidoses MPS-I và MPS-II. Lý do của việc trị liệu không kết quả, cội nguồn là do các biến đổi lâm sàng của bệnh nhân cũng như sự khác biệt giữa các type của bệnh.

Các nghiên cứu khác cũng chỉ rõ rằng việc cấy ghép có thể sẽ đem lại những lợi ích lâm sàng rõ rệt đối với các bệnh đặc biệt như MPS-I, nhưng bệnh nhân phải được cấy ghép trước khi có những suy giảm đáng kể về chức năng trong CNS. Dưới những điều kiện này, những sự hư hại thần kinh có thể được phòng ngừa hoặc làm cho tiến triển chậm lại.

Cho tới nay, việc ghép tủy cũng chỉ có thể khuyến cáo như một phương pháp điều trị hiệu quả một phần đối với LSD (xem bảng 13.1). Trong quá trình cấy ghép người ta hy vọng rằng sự tiến triển của bệnh sẽ chậm lại, nhưng nó bị hạn chế bởi các rủi ro do sự kiểm chế miễn dịch. Nhằm nâng cao khả năng cấy ghép cho những bệnh nhân mà không cần người cho phải là anh chị em ruột, người ta đã sử dụng nhiều đơn vị cấy ghép của người cho không có quan hệ huyết thống cho những bệnh nhân nặng. Tạp chí “North American experience” đã thông báo cấy ghép được trên động vật không có quan hệ di truyền MPS-IH (kiểu hình nghiêm trọng) và khẳng định có 50% bị chết trong những năm đầu cấy ghép và các mảnh ghép có tác động cao tới việc chống trở bệnh tật của vật chủ. Đây là một vấn đề phức tạp vì kiểu hình càng nghiêm trọng cần phải được cấy ghép sớm thì lại càng tránh được sự nhiễm độc. Tuy nhiên, quá trình cấy ghép để làm đảo ngược tình trạng bệnh của vật chủ liên quan tới CNS lại làm hủy hoại thần kinh do sự tích tụ của lysosome.

Tóm lại, bằng cách phân tích di truyền có thể xác định được các ứng cử viên GTL trong điều trị bệnh. BMT được đánh giá là có hiệu ứng đặc biệt trong một số bệnh như Gaucher type I và MPS-IH, nhưng lại bị giới hạn bởi việc tìm kiếm đối tượng cho thích hợp và liên quan với vấn đề độc tố. Như vậy, cách tiếp cận này chỉ áp dụng được cho các bệnh nhân với các bệnh có ít rủi ro, còn với các nhóm bệnh khác thì chưa thấy những bằng chứng lâm sàng về hiệu ứng của BMT hoặc thay thế enzyme. Trong những trường hợp này bắt buộc phải tìm kiếm các chiến lược khác.

13.4 Các mô đích của GTL

Mốc đầu tiên phải cam kết với các thao tác gen trong LSD là phải phân dòng được hầu hết các gen. Tuy nhiên, cDNA của nhiều LSD lại nhỏ hơn 5 kb vì thế các vec tơ retrovirus thế hệ thứ nhất có thể cài được vào. Các mô hình trên động vật đã thực hiện được với khá nhiều bệnh như (bảng 13.2). Cũng từ các mô hình này mà thiết lập được các hệ thống hữu hiệu đánh giá các chiến lược trị liệu.

13.4.1 Ghép các tổ chức mới

Những thử nghiệm đầu tiên của GTL được xây dựng trên cơ sở hiện tượng hiệu ứng chéo của lysosome như đã trình bày ở phần trước và trên các kết quả lâm sàng của việc ghép tủy xương dị gen. Và thật ngẫu nhiên, với cách tiếp cận như vậy khi người ta làm các test với các vec tơ thế hệ thứ nhất đã thấy nó có thể sử dụng được trong lâm sàng. Moullier và cộng sự hướng vào phương pháp tiết để hiệu chỉnh chéo lysosome thông qua sự tiết của tổ chức mới được ghép bằng phẫu thuật với nguyên bào sợi của da đã tải nạp và áp dụng kỹ thuật này để tạo ra cả β -glucuronidase (MPS-VII) và β -L-idunidase (MPS-I). Các nhà nghiên cứu đã gắn một khuôn có các sợi polytetrafluoroethylene bọc yếu tố phát triển nguyên bào sợi cơ bản và được ghép vào khoang màng bụng chuột thiếu hụt β -glucuronidase. Khuôn này đã phát triển thành mạch máu và có khả năng hoạt động như một nơi chứa các nguyên bào sợi của da thâm chuyển biểu hiện gen β -glucuronidase. Trong những thí nghiệm này sự biểu hiện của β -glucuronidase được chứng minh là từ cơ quan được ghép mới với thời gian 3 tháng. Các enzyme không bị biến đổi trong gan chuột được cấy ghép, hiện tượng này ngược với việc dùng phẫu thuật cắt bỏ các cơ quan mới. Điều này chỉ rõ rằng việc chuyển hoạt tính bằng một quá trình tiết cho kết quả khá hơn là việc di trú các cấu trúc tế bào của tổ chức mới vào trong gan. Hoạt tính này cũng có ở phổi động vật, mặc dầu với tần số thấp hơn (2 trong 3 động vật được xử lý không biểu hiện hoạt tính), với lách thì chưa có cơ sở tin cậy, và với các tế bào máu có nhân thì dường như không có hiệu ứng. Các nghiên cứu toàn diện hơn ở chuột MPS-VII cũng bởi nhóm nghiên cứu này đã khẳng định là có khả năng chỉnh lý chéo sự tồn trữ lysosome ở gan và lách chuột đã lớn (4-8 tuần lễ) và cũng chứng minh rằng enzyme này định vị chủ yếu ở đại thực bào. Đáng tiếc là mức enzyme đạt được ở các mô ngoại biên chỉ đạt 0,5 - 6% mức bình thường, tuy nhiên vẫn có những biến đổi thật sự ở các động vật được xử lý. Mặc dầu enzyme không vượt qua được hàng rào máu - não bộ, nhưng đôi khi thấy rải rác các tế bào dương tính với β -glucuronidase có ở các CNS và đoán chừng là đại diện của các đại thực bào chịu được tác động enzyme. Với các vết enzyme phát hiện thấy ở mô não thì cũng chưa đủ khả năng tạo ra những biến đổi lớn nào về các bất thường thần kinh ở chuột. Đặc trưng thứ hai của nghiên cứu này là quá thời điểm thí nghiệm khởi đầu

nhiều động vật đã phát triển kháng thể kháng enzyme β -glucuronidase của người, tuy nhiên hiệu ứng này đã được phòng ngừa bằng sự kiểm chế miễn dịch thích ứng.

Bảng 13.2 Mô hình thực nghiệm trên động vật các bệnh do tích tụ lysosome

nhóm	Bệnh đặc hiệu	Thiếu hụt enzyme	Mô hình động vật
Mucopolysaccharidosis	MPS-I	β -L-iduronidase	Mèo Chó
	MPS-III	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	Dê
	MPS-VI	Arylsulfatase B	Chó
	MPS-VII	β -glucuronidase	Chó Chuột
Sự trhoái biến glycoprotein và các cấu trúc	β -Mannosidosis	β -Mannosidase	Trâu bò Mèo
	β - Mannosidosis	β - Mannosidase	Dê
	Fucosidosis	β -L-fucosidase	Trâu bò Chó
Lipidosis cholesterol tế bào	Bệnh Niemann-Pick type C	Chưa rõ	Chuột
Sphingolipidosis	Bệnh Gaucher	Acid β -glucosidase	Chuột knockout
Galactosylceramide lipidosis	Bệnh Krabbe	Galactosylceramidase	Chuột Chó Cừu Khỉ
G _{M1} gangliosidosis	Thiếu hụt β -Galactosidase	Acid β -Galactosidase	Mèo Chó Cừu Bê
G _{M1} gangliosidosis	Bệnh Sanhoff	β -Hexosaminidase B	Mèo
	Thiếu hụt hoạt hóa G _{M2}	Protein hoạt hóa G _{M2}	Chó

Khó có thể so sánh trực tiếp hậu quả của những thí nghiệm này với các trị liệu tương đương gần nhất. Tuy nhiên, cũng cần phải lưu ý rằng những con chuột non MPS-VII (0-6 tuần lễ) được xử lý với enzyme tái tổ hợp với liều đơn hoặc kép, sau đó là các liều khác nhau ở nhiều tổ chức thì sẽ có mức chuyển enzyme cao hơn, 35% hoạt tính enzyme bình thường đạt được ở gan và 6% ở não bộ. Những hiệu ứng tốt làm giảm sự tích tụ lysosome cũng biến động nhiều trong các mô, kể cả các neuron - tuy nó không thuộc quần

thể thần kinh đệm. Điều đó cho thấy việc sử dụng đa liều sẽ cho hiệu quả cao hơn ở chuột MPS-VII còn non. Vấn đề này còn rất phức tạp và mọi người đang trông đợi vào những thành công mới của các thực nghiệm cấy ghép.

13.4.2 Thao tác với các tế bào lympho

Nguồn mô thứ hai có thể hữu ích cho việc sản xuất và chuyển vận protein là các tế bào lympho sơ cấp của người. Mặc dầu các tế bào lympho B và T chỉ tiết ra một lượng nhỏ protein lysosome nhưng chúng lại có tính năng của một enzyme chuyển vận do sự tiếp xúc trực tiếp tế bào. Những quan sát đầu tiên này vào năm 1981 cho thấy các tế bào lympho đã hiệu chỉnh chéo nguyên bào sợi ở những bệnh nhân LDS MPS-VII (hội chứng Sly). Điều kiện thuận lợi này không áp dụng một cách vụn vặt đối với tất cả các LSD và rất ngoại lệ với sự chuyển enzyme trong bệnh Gaucher. Hai dạng enzyme β -D-mannosidase có liên quan với mạng lưới nội chất và khoang Golgi cũng không được vận chuyển. Tuy nhiên, một dạng tiền thân có trọng lượng phân tử lớn của enzyme lại có thể được xử lý một cách chính xác rồi được chuyển vận và cuối cùng có khả năng hiệu chỉnh chéo chức năng. Ngoài β -glucuronidase còn có một enzyme iduronate-2-sulfatase cũng được chuyển để hiệu chỉnh nguyên bào sợi của các bệnh nhân bị tác động bởi các LSD tương ứng.

Braun và cộng sự đã thực hiện các quan sát này và khai thác khả năng của các tế bào lympho đã công nghệ hóa để hiệu chỉnh những bất thường về chức năng ở những bệnh nhân thể nhẹ của thiếu hụt LSD iduronate-2-sulfatase (MPS-II, hội chứng Hunter). Nhờ sử dụng các vec tơ L2SN lưỡng tính đã biểu hiện cao iduronate -2-sulfatase ở các dòng tế bào nguyên bào lympho lấy từ bệnh nhân MPS-II. Những tế bào này được nuôi cấy cùng với các nguyên bào sợi của bệnh nhân đã được hiệu chỉnh những bất thường về chuyển hóa.

Các quy trình của việc phân lập và việc triển khai mở rộng đã được thiết lập một cách hoàn hảo và các tế bào lympho được công nghệ hóa đã sử dụng thành công trong một nghiên cứu lâm sàng điều trị bệnh thiếu hụt miễn dịch sơ cấp adenosine deaminase. Với nền tảng này Whitley và cộng sự đã đi tới một quy trình lâm sàng để đánh giá các tế bào lympho công nghệ hóa trong MPS-II. Tuy nhiên, vì các tế bào lympho không phải là cấu trúc chính của mô CNS nên cũng không hy vọng cách tiếp cận này sẽ mang lại nhiều lợi ích cho các LSD đã có thoái hóa thần kinh, vì vậy công trình này chỉ được hạn chế với các bệnh nhân có kiểu hình nhẹ và không liên quan tới CNS.

13.4.3 Ghép tủy xương tự thân

Ghép tủy xương đã được nhìn nhận là một cách tiếp cận hữu hiệu đối với một số LSD. Chẳng có gì ngạc nhiên khi người ta quan tâm nhiều tới cách làm thay đổi việc sản xuất enzyme thông qua các thao tác gen và sử dụng tủy xương của bản thân. Cách tiếp cận này đã tạo điều kiện cho việc ghép tủy cho các bệnh nhân mà không cần đòi hỏi người cho là anh chị em ruột, nhưng thường chỉ tạo được mức enzyme thấp. Chiến lược sử dụng đối tượng cho không có quan hệ huyết thống cũng chỉ có khả năng với một số nhóm chủng tộc, bởi vì trong một tổ hợp các chủng tộc người cho mang rất nhiều rủi ro chết chóc và bệnh tật cho các bệnh nhân, đặc biệt là ở trẻ em. Một nhận xét lý thú là khi ghép các tế bào gốc tạo máu tự thân không cần phải có các điều kiện khởi đầu (tạo thuận lợi

cho việc cấy ghép). Tiềm năng của cấy ghép có thể làm thuyên giảm bệnh tật và không chứa các tổ chức ghép làm đảo ngược việc điều trị bệnh, giảm nguy cơ chết chóc nên có thể thực hiện việc cấy ghép cho trẻ em ngay từ những tháng đầu của cuộc sống cũng như với các bệnh nhân nhẹ hơn nhưng vẫn bị suy yếu kéo dài.

Nguồn cung cấp các tế bào tự thân cho việc kiến tạo lại các tế bào tạo máu dài hạn là tủy xương (số lượng ít) và máu dây rốn (số lượng nhiều hơn). Các phương pháp tải nạp hiệu quả các tế bào này là vectơ retrovirus, tuy nhiên còn phải lưu ý tới các tác động bởi quy trình tải nạp. Nhiều nhà nghiên cứu đã nhắm vào các tế bào tổ tiên như là đích đầu tiên của sự chuyển gen vì các tế bào này không có số lượng cao trong máu và vòng quay của nó cũng nhanh hơn nên tạo thuận lợi cho sự tải nạp của retrovirus. Tiêu chuẩn vàng cho việc đánh giá thành công của sự chuyển gen đối với một bộ phận các tế bào tổ tiên nguyên thủy có khả năng tái tạo tủy xương dài hạn trước tiên là các tế bào tải nạp phải có khả năng cứu vãn được những bệnh nhân đã dùng hóa trị liệu hoặc tia xạ mà tủy đã bị tổn hại nhiều, thứ hai là phải chứng minh được có sự tồn tại của gen chuyển và biểu hiện dài hạn *in vitro* trong các mô hình tạo máu.

Trước hết chỉ có thể áp dụng các định giá tiền lâm sàng của GTL để đánh giá các quy trình (protocol) lâm sàng trên các mô hình động vật thích ứng (xem bảng 13.2). Tuy nhiên, cũng cần phải làm sáng tỏ liệu có sự biểu hiện gen lâu dài ở các tế bào người hay không cũng như tính khả thi của mô hình này. Mô hình *in vitro* tốt nhất cho việc test sự tải nạp dài hạn của các tế bào khôi phục quần thể của tủy xương là một hệ thống nuôi cấy dài hạn đã được cải biến Dexter. Ở đó tủy xương người có thể duy trì được trong môi trường nuôi cấy 6 tháng. Trong 5-6 tuần lễ đầu tiên nuôi cấy, các tế bào tổ tiên chưa được tách dòng. Hoạt tính tạo máu sau này là do chính các tổ tiên sớm này và có thể khảo sát được thông qua các thí nghiệm về những biến đổi trong sự hình thành quần thể. Mô hình này được chấp nhận để thu thập các số liệu về chuyển và biểu hiện gen ở các tế bào tổ tiên. Hệ thống nuôi cấy dài hạn cũng được sử dụng để khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới việc chuyển và biểu hiện gen retrovirus trong các tế bào tổ tiên thu nhận từ máu ngoại biên và tủy xương của bệnh nhân Gaucher. Các tế bào tổ tiên của tủy xương và máu ngoại biên đều được kiểm tra về khả năng chuyển và tải nạp ổn định với các tế bào tạo quần thể và bộc lộ vec tơ retrovirus có mang gen glucocerebrosidase. Một tổ hợp các cytokine, interleukin -3 (IL-3), IL-6 và yếu tố tế bào gốc cùng với chất đệm hỗ trợ đã cho tải nạp tốt nhất trong 5 tuần lễ ở môi trường nuôi cấy. Hiệu ứng của chất đệm và tổ hợp cytokine đối với sự chuyển gen của các tế bào tiền thân ở máu ngoại biên là 70% số quần thể dương tính với glucocerebrosidase trong 5 tuần lễ.

Các thí nghiệm tương tự cũng được thực hiện bởi Fairbairn và cộng sự với gen β -L-iduronidase (MPS-I). Nhóm này đã chứng minh khả năng sản xuất tuyệt vời β -L-iduronidase trong nuôi cấy dài hạn 6 tháng, khi mà các tế bào nuôi cấy đã trở nên già yếu. Tuy nhiên, họ cũng chứng minh có mức chuyển cao đối với các tế bào tổ tiên nguyên thủy mà không cần đến các chất đệm khác hay các yếu tố sinh trưởng hoặc sự tải nạp cường độ cao. Trong khi đó cũng chưa rõ tại sao nhóm nghiên cứu này lại thu được thắng lợi đặc biệt với mức chuyển gen cao mà lại không cần thêm các cytokine hay thao tác nhanh các tế bào. Đây có thể là một tiện lợi lớn và là yếu tố quan trọng để tránh việc phải “tổng giam” các tế bào non trước khi thực hiện việc chuyển gen. Về khía cạnh chức năng thì β -L-iduronidase đã được tiết ra môi trường và hiệu chỉnh được sự tổn động lysosome xét trên cả góc độ tổ chức học cũng như thông qua sự giảm sút S^{35} đánh dấu của các tế bào.

Những nghiên cứu này là những bằng chứng tốt về tiền lâm sàng để có thể đi tới các thử nghiệm lâm sàng trên bệnh nhân. Lashford và cộng sự đã có một thử nghiệm lâm sàng về tủy xương điều trị nhóm bệnh MPS-IH. Trong trường hợp bệnh Gaucher lại còn thêm các dẫn liệu xa hơn từ các nghiên cứu trên động vật. Những công trình này chỉ rõ tủy xương chuột có thể tải nạp cao bởi các retrovirus (MPSG và LN) có chứa gen glucocerebrosidase người và những tế bào có khả năng kiến tạo lại ở các đối tượng nhận đã bị tia xạ liều chí tử. Hoạt tính của glucocerebrosidase mức cao cũng thấy ở đại thực bào sau ghép tủy và biểu hiện gen này ở chuột tới 7 tháng. Động học của sự biểu hiện glucocerebrosidase trong quần thể đại thực bào cũng đã được nghiên cứu chi tiết. Nhờ việc sử dụng các vec tơ retrovirus khác nhau (N₂) Krall và cộng sự đã ghép tủy xương được tải nạp vào chuột đã tia xạ chí tử. Ở những thời điểm đầu (1-2 tháng sau khi ghép), các tế bào chủ chốt đã thấy ở lách, máu, tủy xương và tuyến ức của chuột. Sau đó các tế bào cũng thấy ở các mô khác, kể cả CNS. Đối với mô gan thì quần thể đại thực bào tăng tới 10% ở tháng thứ nhất và 70% ở tháng thứ 6. Sự tăng tương tự cũng thấy ở quần thể vi mô thần kinh đệm của CNS – đạt 20% số tế bào phân phối quanh mạch với thời gian khoảng gần 6 tháng. Với CNS thì như vậy nhưng với LSD thoái hóa thần kinh thì không hiểu tại sao hiệu ứng lâm sàng của ghép tủy xương lại có nhiều biến đổi đến như vậy?

Có vẻ như là có sự cộng tác của các yếu tố trong đó có kể đến những sự hư hại từ trước (tuổi tác và các bệnh liên quan), mức enzyme của người cho (anh chị em ruột đồng gen và dị gen), bản chất của các chế độ sinh hoạt (liên quan tới tuổi và sự lựa chọn thầy thuốc) và mức biểu hiện M6P-R ở các cấu trúc mô (liên quan tới tuổi). Các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* trên động vật đã chứng minh rằng có khả năng protein lysosome được vận chuyển tới tận các neuron và thần kinh đệm. Một công trình tương tự của Walkley và cộng sự với mô hình trên mèo □- D-mannosidosis đã chỉ rõ rằng việc ghép tủy xương từ các bạn đồng lứa (littermate) kiểu hình bình thường vào mèo con đã cho kết quả 9-40% hoạt tính enzyme bình thường trong các CNS. Mức cao nhất của mannosidase cũng liên quan tới vi mô thần kinh quanh mạch và enzyme cũng thấy có ở các neuron và các quần thể thần kinh đệm. Điều quan trọng là các nghiên cứu này đã khảo sát giá trị của BMT trong việc hiệu chỉnh các bất thường của mô khi đã bị tia xạ chí tử. Trong 2 nghiên cứu đơn đều cho thấy có mối liên quan giữa tia xạ và mức độ biểu hiện enzyme (tăng liều lượng tia xạ thì sự biểu hiện enzyme sẽ tốt hơn ở tất cả các mô). Điều này phản ánh rằng khi tia xạ với liều cao hơn sẽ giúp cho việc cấy ghép tốt hơn nhưng lại làm tăng độc tính cho đối tượng được ghép. Như vậy là tủy xương công nghệ hóa đã làm thuyên giảm bệnh tật do việc tăng cường lượng enzyme cũng như tăng cường đáp ứng miễn dịch với các bệnh nhân có kiểu hình vô lực.

13.4.4 Đích trực tiếp của hệ TKTƯ (CNS)

Có 2 chiến lược chính để nâng cao sự chuyển và biểu hiện gen trong hệ TKTƯ: (1) tải nạp tế bào với các vec tơ hướng thần kinh và (2) ghép tế bào não. Các vec tơ retrovirus được sử dụng cho các thí nghiệm GTL đầu tiên cũng khá quan trọng đối với CNS, vì chúng có khả năng tải nạp trong các tế bào hậu gián phân.

Có 2 virus nổi bật như là các vec tơ tiềm năng đối với sự chuyển gen tới CNS là adenovirus và herpes simplex virus (HSV). Với HSV có lẽ dễ dàng nhận ra rằng đó là một vec tơ tiềm năng đối với hệ TKTƯ. HSV có khả năng thâm nhiễm và sao chép được trong hầu hết các dạng tế bào nhưng lại làm tiêu tế bào. Tuy nhiên, khi các neuron ngoại biên bị

thâm nhiễm thì virus lại không làm tiêu (ly giải) tế bào mà lại thiết lập một trạng thái tiềm tàng (latent state), ở đó hệ gen virus tồn tại như một episome nhân. Những vị trí chính của sự thâm nhiễm tiềm tàng là hạch gốc lưng và tính đặc hiệu mô này là do một yếu tố phiên mã đặc hiệu tế bào, OCT-2, nó gắn vào promoter gen sớm (early gen promoter) của DNA virus. Các vec tơ cơ sở HSV muốn “tư bản hóa” (capitalise) tính hướng neuron và tiềm tàng các virus hoang dại. Tuy nhiên, vấn đề chính trong việc tạo một vec tơ như thế đều xoay quanh vấn đề phải lưu tâm tới các rủi ro lâm sàng nếu mất khả năng tiềm tàng và xảy ra sự tái hoạt kế tiếp vòng tiêu tố (lytic life cycle) trong các hệ TKTƯ. Vấn đề thứ hai là việc xác định một promoter thích hợp có khả năng thích ứng với sự biểu hiện gen trị liệu.

Trong kịch bản đầu tiên việc tái hoạt của một vec tơ HSV trong não có thể sẽ gây nên viêm não. Khi một HSV có độ chuẩn cao được tiêm vào não động vật thì chúng sẽ không tránh khỏi bệnh viêm não cảm ứng bởi virus.

Để tạo ra một vec tơ làm vô hiệu hóa thì phải có nhiều tái tổ hợp, trong đó có cả virus đã được loại bỏ gen thymidine kinase (TK) - tạo một enzyme cần cho sự sinh trưởng của virus trong các neuron. Một chiến lược khác là loại bỏ các trình tự gen sớm (early gen-IE) tức khắc. Nhiều thí nghiệm đã xem xét chiến lược đầu tiên là loại bỏ các TK virion và cài các cDNA của enzyme cứu hộ purine, hypoxanthine phosphoribotransferase. Khi đưa các vec tơ này vào não chuột sẽ gây độc đáng kể trong các CNS và cũng chẳng có gì để chứng minh được rằng đây là một vec tơ virus an toàn đối với người. Quan điểm thứ hai lại đòi hỏi phải được cung cấp các chức năng gen IE từ các nguồn ngoại sinh. Vấn đề này đã thu được thành quả nhờ sự tăng trưởng của virus vô hiệu hóa trong các dòng tế bào nuôi cấy đã được công nghệ hóa để biểu hiện gen IE. Đáng tiếc là có thể có rủi ro do sự tái sinh virus nguyên vẹn thông qua tái tổ hợp giữa các virus khiếm khuyết và các trình tự gen trong các tế bào nuôi cấy, và đôi khi cũng tạo ra một vec tơ không thể chấp nhận được cho việc sử dụng trên người. Một quan điểm khác lại phát triển các vec tơ cơ sở HSV có chứa tất cả các trình tự tác động *cis* cần cho sự sao chép và đóng gói DNA của chúng trong các virion, nhưng chỉ sản sinh ổn định khi có mặt virus hoang dại, chúng sẽ cung cấp các protein hoạt chuyển cho những quá trình này. Đáng tiếc là toàn bộ kho virus cuối cùng này là một tổ hợp của vec tơ đóng gói và HSV hoang dã nên tiềm ẩn khả năng gây độc của các virus hoang dã tới 100%. Trong khi đó cũng có chiến lược sản xuất virus trợ giúp khiếm khuyết, tuy nhiên vẫn chưa đạt tới mức an toàn cho các thí nghiệm trên người.

Ngoài vấn đề chính là sự an toàn, vấn đề thứ hai lại liên quan tới việc tạo ra các vec tơ HSV mà promoter được xác định là thích hợp đối với sự biểu hiện gen dài hạn ở trạng thái bất hoạt phiên mã tiềm tàng. Những vec tơ này đã được sử dụng để hoạt hóa sớm các gen cần cho việc sản xuất các sản phẩm gen IE cho hoạt tính cao và tránh được mạo hiểm của sự hoạt hóa tiêu tố (ly giải) kế tiếp. Tuy nhiên, khi promoter kiểm chế đặc hiệu các tế bào neuron bị thâm nhiễm thì sẽ không có khả năng duy trì sự biểu hiện dài hạn các gen nghiên cứu. Vì vậy, sự lựa chọn tốt nhất là promoter LAT, nó được thâm nhiễm ở trạng thái hoạt hóa phiên mã tiềm tàng. Nhờ việc sử dụng promoter LAT mà biểu hiện dài hạn các gen nghiên cứu ở hệ thần kinh ngoại biên và sự biểu hiện qua trung gian HSV-LAT của enzyme lysosome, β -glucuronidase trong CNS của chuột MPS-VII với thời gian 4 tháng.

Về vấn đề này, nhiều nhóm nghiên cứu đã hướng tới việc làm biến đổi các hệ thống vec tơ adenovirus, mặc dầu chúng có tính hướng biểu mô nhưng cũng có khả năng thâm nhiễm được CNS. Cũng giống như HSV adenovirus, nó có khả năng thâm nhiễm các tế bào

hậu gián phân và tự thiết lập một episome. Những vec tơ được phát triển đã loại bỏ các gen IE sẽ làm cho virus không có khả năng tự sao chép. Việc loại đi các cấu trúc phụ trong hệ gen virus như vùng E3 và E5 đã đủ khả năng để cài được các gen ngoại lai. Đối với LSD, các vec tơ adenovirus được tạo ra nhằm vận chuyển gen MLD, ARA và enzyme này đã biểu hiện được *in vitro* cả trong nguyên bào sợi cũng như trong các mô đích cuối cùng là các tế bào đuôi gai (oligodendrocytes). Đây là các công trình nghiên cứu đã lâu và chưa có các thông tin về những biểu hiện dài hơn cũng như hiệu ứng trong các mô hình động vật thích hợp. Cho tới nay, sự biểu hiện gen qua trung gian adenovirus của các gen nghiên cứu đã chỉ rõ rằng sự biểu hiện protein trong các CNS tương đối nhất thời.

Đáng tiếc là lại có một số vấn đề liên quan tới độc tính của adenovirus. Nhiều công trình nghiên cứu trên chuột và động vật cao cấp cho thấy có đáp ứng miễn dịch đáng kể của vật chủ với vec tơ. Hiệu ứng này là do mất chức năng của E3 (trong các virus nguyên vẹn nó kích thích sự biểu hiện của kháng nguyên lớp I phức hợp hòa hợp tổ chức chính, vì thế mà kìm hãm được đáp ứng miễn dịch của vật chủ đối với virus thâm nhiễm). Cuối cùng là, có nhiều công trình quan tâm tới việc khảo sát loại bỏ các yếu tố khác của hệ gen virus để tạo được hệ thống an toàn hơn và ít tính sinh miễn dịch hơn.

Cho tới nay nhiều công trình nghiên cứu về các vec tơ adenovirus có liên quan tới gen dấu chuẩn (marker gene) cả *in vitro* cũng như trong ghép trực tiếp vec tơ vào não bộ. Đường như là sau khi tiêm trực tiếp đã chuyển được một lượng tương đối các chất liệu di truyền xung quanh vị trí tiêm, nhưng không phải toàn bộ CNS bị thâm nhiễm và tải nạp bởi vec tơ virus. Đây có vẻ như là các vấn đề thực tiễn khi phải chuyển giao DNA diện rộng đối với các bệnh nhân. Các nhà nghiên cứu thấy có sự phá vỡ hàng rào máu- não do các tác nhân thẩm thấu khi tiêm adenovirus vào máu để rồi chuyển vào các CNS. Với mức độ đạt được hiện nay vẫn chưa đủ cơ sở để khẳng định là việc sử dụng các vi thần kinh đệm để chuyển gen hệ TKTƯ là thuận lợi. Chắc chắn cần phải có các công trình xa hơn nữa xác định được một vec tơ hướng thần kinh có khả năng chuyển gen hệ TKTƯ diện rộng an toàn và hiệu lực. Các nhà nghiên cứu đã nhìn nhận tới việc ghép tế bào cho các quần thể hệ TKTƯ.

Điều hứa hẹn nhất của những cách tiếp cận này là thăm dò các tế bào thần kinh tổ tiên dùng cho chuyển gen. Bước tiến căn bản là đã chứng minh được rằng mô thai nhi người có khả năng ghép được vào các hệ TKTƯ trưởng thành. Trong bệnh Parkinson, khi được ghép mô thai nhi đã thấy có sự hình thành các kết nối thần kinh và hiệu ứng lâm sàng kéo dài ít nhất 18 tháng. Những thí nghiệm như thế chỉ rõ tiềm năng của cấy ghép tế bào trong CNS, tuy nhiên không có sự phục hồi quần thể với hệ thần kinh đệm và kỹ thuật này chỉ có thể ứng dụng điều trị những rối loạn tương đối cục bộ. Trong các nghiên cứu trên động vật, các nhà nghiên cứu đã có được các tế bào bắt tử từ lớp hạt bên ngoài của não bộ do tải nạp với các gen gây ung thư như *myc*. Sau khi tiêm vào não thấy những dòng tế bào cấy ghép ổn định này thông qua hệ TKTƯ thì chúng có thể biệt hóa thành các neuron cũng như các tế bào thần kinh đệm. Những tế bào được tiêm vào não thất của chuột MPS-VII thấy được ghép ở sọ ngay cả khi vắng mặt các điều kiện ưu tiên hoặc kìm hãm miễn dịch; 97% số động vật có bằng chứng cấy ghép được lan rộng, mặc dầu có một số biến đổi có tính chất cục bộ vùng. Tất cả các vùng này đều có mức hoạt tính enzyme lớn hơn 2% bình thường. Các thực nghiệm ghép mở rộng hơn ở động vật không thấy có những thoái hóa thần kinh như thường xảy ra ở chuột MPS-VII.

Bằng chứng tương tự theo cách tiếp cận này cũng thu được từ những nghiên cứu, trong đó các dòng tế bào thần kinh tổ tiên được tải nạp với các tiểu đơn vị β (β subunit) của enzyme β -hexosaminidase (β -N-acetylgalactosaminidase, thiếu hụt trong bệnh LSD Tay-

Sachs) cùng với gen dấu chuẩn β -galactosidase. Khi chuyển dòng tế bào này vào thai và chuột sơ sinh lại tái khẳng định tiềm năng của việc cấy ghép diện rộng dài hạn và mức enzyme phát hiện được cao hơn mức kiểm soát ở lứa tuổi đó. Mức enzyme cao nhất đạt được khi cấy ghép vào mô của bào thai.

Dĩ nhiên có rất nhiều khó khăn khi ứng dụng trên người, có nhiều vấn đề liên quan tới sự bất tử hóa các tế bào thần kinh với các gen gây ung thư đã biết và tiềm năng cảm ứng gây khối u thứ cấp. Mặc dù chưa có vấn đề gì về các khối u thứ cấp ở chuột, nhưng vẫn còn vấn đề về tính an toàn đối với các thử nghiệm trên người.

Một cách tiếp cận khác của việc nhân rộng các tế bào thần kinh tổ tiên mà không cần phải bất tử hóa có lẽ về mặt kỹ thuật là khả thi, nhưng cho tới giờ những tế bào này vẫn chưa được ghép chuẩn và không có khả năng thực hiện được trong các CNS. Cuối cùng, cần phải có nhiều công trình nữa mới có thể đưa ra được phương pháp tin cậy để chuyển enzyme hệ TKTU.

13.5 Kết luận

Các bệnh liên quan tới lysosome có một số khó khăn về mặt kỹ thuật trong GTL, nhưng cũng có những cơ hội điều trị tốt. Đối với một bệnh như Gaucher type I nó chỉ bị tác động bởi một dạng tế bào chính và có thể điều trị thành công bằng cách ghép tủy xương khác loại. Thao tác gen đối với tủy xương tự thân tạo ra một tiềm năng thật sự làm giảm bớt tỷ lệ tử vong cho bệnh nhân. Mặt khác, lại có nhiều bệnh bị tác động ở các mô phụ, kể cả trường hợp CNS, trong những trường hợp đó thì việc ghép tủy cũng chỉ có tác dụng phần nào. Những bệnh này đòi hỏi phải có những công trình nghiên cứu xa nữa thì mới có được những lợi ích lâm sàng qua gen trị liệu.

Chương XIV

ĐIỀU TRỊ THÂM NHIỄM HIV

14.1 Mở đầu

Hội chứng thiếu hụt miễn dịch mắc phải (HCTHMDMP) (acquired immunodeficiency syndrome –AIDS) là một bệnh dịch lan rộng nhanh chóng trên toàn cầu với khoảng 15 triệu người bị nhiễm virus HIV-1. Mặc dầu hơn một thập kỷ qua với nhịp độ nghiên cứu khẩn trương nhằm tìm hiểu virus HIV-1 và phát triển các phương pháp trị liệu hữu hiệu AIDS, nhưng thâm nhiễm HIV-1 vẫn là một bệnh nguy hiểm và chưa thể chữa khỏi. Tuy nhiên, đã có những tiến bộ đáng kể trong việc điều hành sự sao chép của HIV-1 với việc sử dụng các thuốc truyền thống. Đáng lưu ý nhất là loại nhóm thuốc cặp ba, gồm 3 loại thuốc ức chế chu kỳ sống của HIV-1 ở 2 giai đoạn khác nhau. Một loại ức chế protease, ngăn chặn các quá trình bình thường của protein cần cho sự sản sinh các hạt HIV-1 và các thuốc AZT; 3TC là các chất tương tự nucleoside có tác dụng ức chế sự sao chép hệ gen virus và đặc biệt là thành phần “cocktail” của thuốc cặp ba. Nhịp độ đột biến cao trong hệ gen virus và sự sản sinh các chủng kháng thuốc của HIV-1 là các yếu tố chính ngăn trở

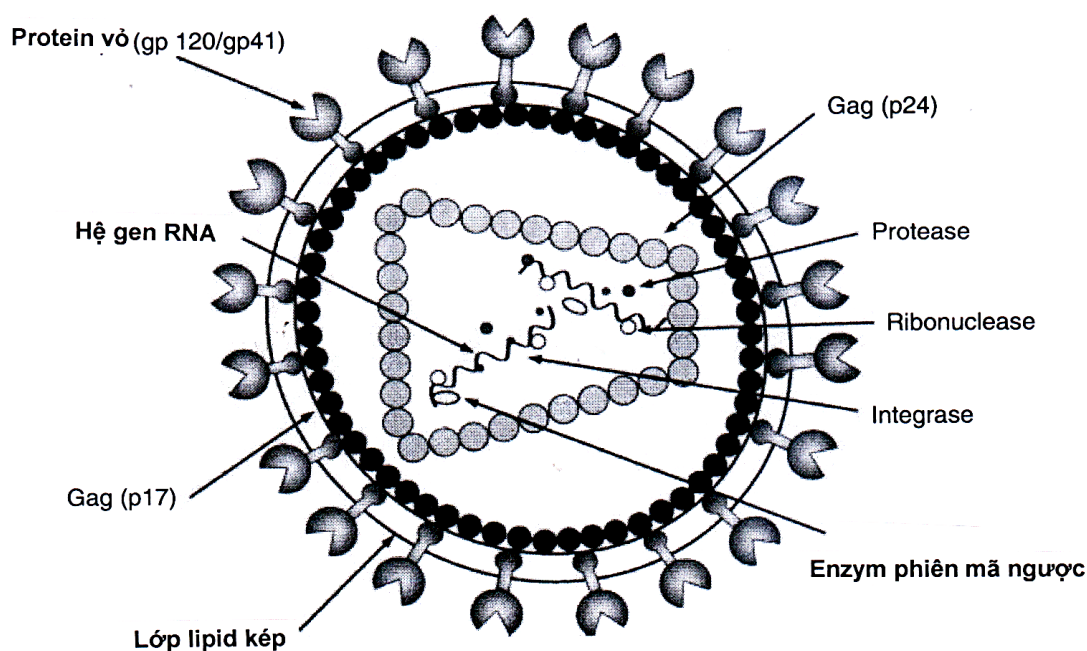
việc phát triển các phương pháp trị liệu bằng thuốc. Nhóm thuốc cặp ba cũng chưa được làm test đầy đủ để xem liệu có khả năng hình thành các thể HIV-1 đột biến kháng thuốc hay không? Vì các thuốc trị liệu truyền thống không có khả năng ức chế hiệu quả sự sao chép của HIV-1, nên cần phải phát triển các phương pháp trị liệu mới cho căn bệnh chết người này.

Theo chu kỳ sống của một virus bình thường thì HIV-1 có thể hợp nhất vào hệ gen tế bào chủ và tồn tại vĩnh viễn ở đó, vì thế AIDS có thể được coi là một bệnh di truyền mắc phải. Như đã đề cập ở trên, GTL có tiềm năng to lớn đối với việc điều trị các bệnh do di truyền và các bệnh mắc phải liên quan tới gen. Gen trị liệu trên người có thể được định nghĩa là đưa các chất liệu di truyền mới vào trong tế bào một cách nhằm tạo ra các lợi thế trị liệu cho bệnh nhân. Vì thế GTL có thể được dùng để điều trị AIDS do ức chế sự sao chép của HIV-1.

Mục đích cuối cùng của GTL là ức chế sự sao chép của virus HIV-1 và các yếu tố gây bệnh AIDS. Để GTL thâm nhiễm HIV thu được kết quả người ta phải đưa vào cơ thể các gen để ngăn chặn hoặc ức chế đặc hiệu sự biểu hiện gen hoặc chức năng của các sản phẩm gen virus làm cho sự sao chép của virus bị ngăn chặn hoặc bị giới hạn lại. Ý tưởng này về cội nguồn là gây miễn dịch bên trong tế bào và hiện giờ người ta đang xem xét cách trị liệu đối với nhiều tác nhân thâm nhiễm. Cùng với sự can thiệp vào bên trong tế bào, GTL cũng được sử dụng để phòng tránh sự lan rộng của HIV ở ngoài tế bào. Kiểm chế sự lan rộng của virus phải đi cùng với việc duy trì biểu hiện *in vivo* các protein ức chế “bí mật” và kích thích đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với HIV.

14.2 Tổ chức gen HIV

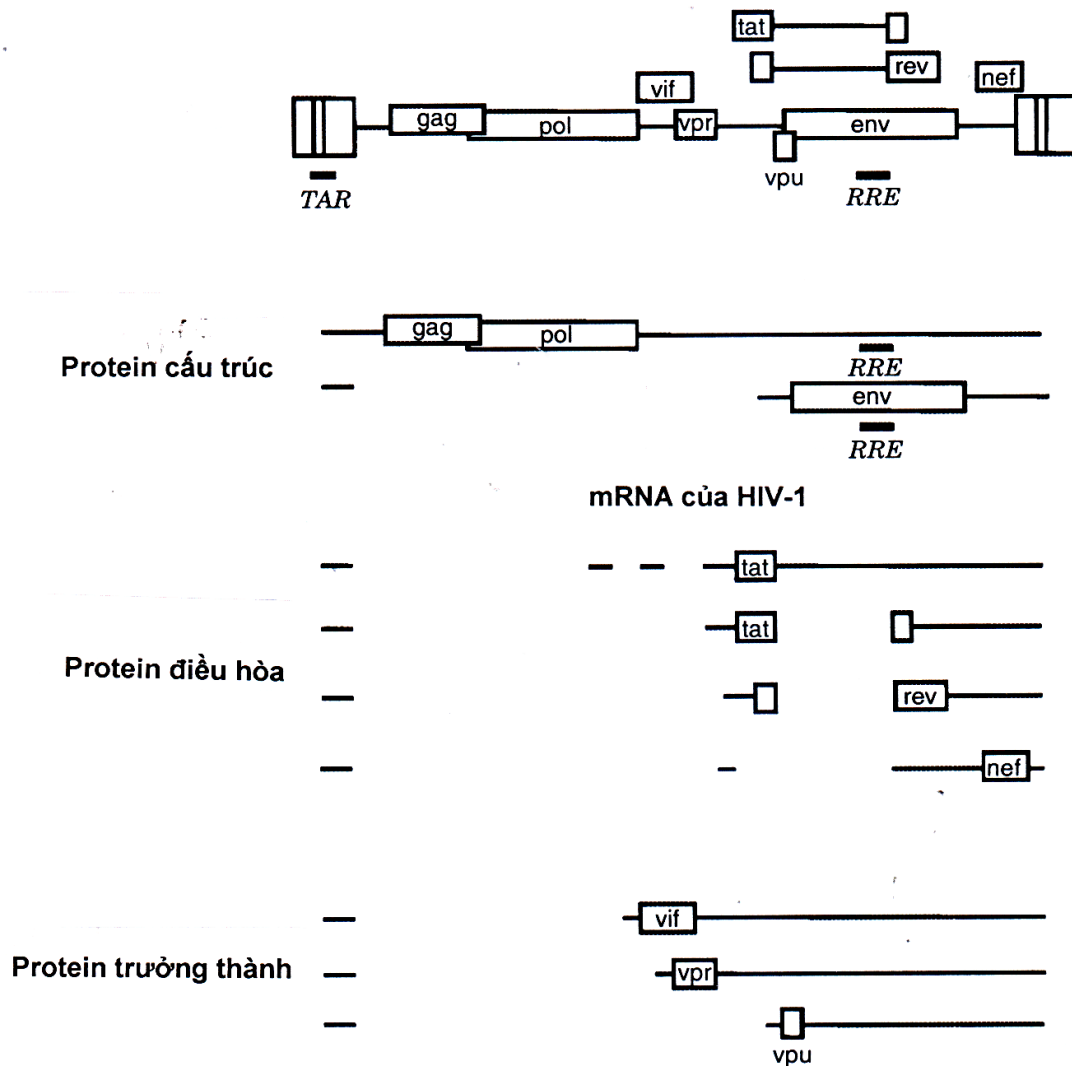
Virus HIV-1 là thành viên của họ retrovirus. Retrovirus thuộc nhóm hỗn tạp các virus có hệ gen acid nucleic chuỗi đơn và enzyme phiên mã ngược. Chức năng của enzyme phiên mã ngược là sao chép RNA hệ gen virus thành DNA chuỗi kép, đó là một pha đặc biệt trong chu kỳ sống của retrovirus. Retrovirus được phân nhỏ thành 3 nhóm cơ bản dựa trên cơ sở hiệu ứng bệnh lý của sự thâm nhiễm. Các dưới nhóm virus gây khối u (oncovirus) bao gồm các retrovirus có thể tạo khối u trong vật chủ thâm nhiễm. Tuy nhiên, nhóm này cũng có một vài virus lành tính. Lentivirus gây các bệnh mạn tính, tiến triển chậm nhưng không có các thành phần tạo khối u. Các dưới nhóm spumavirus, mặc dầu có gây hiệu ứng bệnh lý tế bào đáng kể *in vitro*, nhưng chưa rõ liệu có liên quan gì với sự phát triển bệnh hay không? Khi khảo sát kỹ càng bệnh lý học của thâm nhiễm HIV thì rõ ràng virus này là một thành viên của dưới nhóm lentivirus. Lentivirus phân lập đầu tiên từ những năm 1960 khi người ta phát hiện thấy có một số bệnh thoái hóa tiến triển chậm ở cừu có thể lan truyền được (lây). Điều thú vị là không giống như các retrovirus tạo khối u (oncogenic), các lentivirus không tạo khối u nhưng lại gây độc tế bào (làm chết tế bào). Một vài thành viên của lentivirus đã được phân lập và mô tả. Các thành viên của họ lentivirus bao gồm Visna virus, virus gây THMD trên khỉ (simian immunodeficiency virus). Virus -1 và virus-2 gây viêm não - khớp của dê (caprine arthritis-encephalitis virus) và virus gây thiếu máu thâm nhiễm ở ngựa (equine infectious anemia virus).



Hình 14.1 Tổ chức cấu trúc của virion HIV chín gồm một virion và các protein phụ trợ. Các hạt HIV có đường kính khoảng 110nm, chúng được cấu tạo bởi một lớp màng lipid kép bao quanh một nucleocapsid hình nón. Hai bản phiên mã của RNA chuỗi đơn có chứa các nucleocapsid.
(Theo Bruce Bunnell. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Cũng như các retrovirus khác, HIV là một virus có vỏ bọc, chứa 2 bản phiên mã RNA chuỗi đơn (Hình 14,1). Tổ chức hệ gen của HIV được chỉ rõ ở hình (14..2). Phần cuối hệ gen là 2 vùng gen đồng nhất tương tự như tất cả các retrovirus khác. Các thành phần của gen được gọi là các đoạn lặp tận dài (long terminal repeats-LTR). Các LTR có chứa các yếu tố đáp ứng điều hòa đặc biệt sự biểu hiện gen khi sao chép virus như promoter, yếu tố tăng cường và các yếu tố cần cho sự polyadenylate hóa RNA thông tin hiệu ứng. Giữa các LTR là các gen mã cho tất cả các protein virus. Hệ gen HIV mã cho 3 bộ protein virus là protein cấu trúc (Gag, Pol, Env), protein điều hòa (Tat, Rev, Nef) và protein sinh trưởng (Vif, Vpr, Vpr).

Tổ chức hệ gen của HIV-1



Hình 14.2 Tổ chức hệ gen và sự biểu hiện của HIV-1. Sơ đồ minh họa tổ chức 9 gen nổi trội của HIV. Sơ đồ này đại diện cho các RNA hệ gen HIV-1. Ba lớp protein virus được tạo ra từ mRNA là protein cấu trúc, protein điều hòa, protein sinh trưởng. Các protein cấu trúc gồm protein vỏ virus (gp120, gp41) chúng được mã bởi gen env và các protein lõi (p6, p9, p17, p24) được mã bởi gen gag. Gen pol tạo ra các enzyme phiên mã ngược, integrase, RNase H và enzyme protease gắn virus. Protein điều hòa gắn với virus được mã bởi các gen tat, rev và nef. Protein Tat và Rev là các protein điều hòa mạnh. Protein Tat tương tác với yếu tố TAR (đáp ứng tat) dẫn tới hoạt chuyển mạnh biểu hiện gen virus, trong khi đó protein Rev tương tác với RRE (yếu tố đáp ứng rev), tăng cường sự xuất khẩu của nhân đối với các mRNA virus chuỗi đơn và không ghép nối. Lớp protein thứ ba là các protein sinh trưởng được mã bởi các gen vif, vpr, và vpu. (Theo Bruce Bunnell. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Như hình 14.2, các protein cấu trúc lại có thể được chia thành 3 nhóm: các protein lõi, enzyme và protein vỏ. Ba nhóm protein này được mã bởi các gen *gag*, *pol*, và *env*. Gen *gag* có liên quan tới nhóm kháng nguyên và tạo ra các protein lõi virus có các kháng nguyên tương tác chéo với các kháng nguyên khác trong nhóm retrovirus lớn. Tất cả protein Gag đều được tạo ra như một polyprotein đơn lớn, sau đó được phân nhỏ thành các protein cá thể nhờ một protease mã bởi virus (p24, p18 và p15). Các sản phẩm của gen *pol* cũng được mã từ một khung đọc mở đơn, nó là một polyprotein lớn sau đó cắt nhỏ thành các enzyme có liên quan với virus là protease và enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase –RT), ribonuclease và integrase. Các sản phẩm của gen *env* là các glycoprotein bề mặt, nó được tổng hợp như một polyprotein (gp160). Tuy nhiên, chúng lại được phân nhỏ ra nhờ các enzyme tế bào để tạo nên các glycoprotein bề mặt của HIV (gp120 và gp41).

Hơn nữa, các yếu tố cấu trúc này cũng rất cần cho việc lắp ráp các hạt virus. Hệ gen virus mã cho một số protein cấu trúc giữ vai trò sống còn trong điều hòa chu kỳ sống của virus. Các protein phi cấu trúc được tạo ra bởi HIV có thể chia thành 2 lớp là protein điều hòa và protein sinh trưởng. Các protein điều hòa gồm Tat, Rev và Nef. Protein Tat là một protein điều hòa của virus được mô tả đầu tiên. Protein Tat được mã bởi gen *tat*, nó là một chất hoạt chuyển mạnh đối với sự biểu hiện gen của virus. Nói cách khác, protein Tat điều hòa chức năng của các gen không thật liên kề. Protein Tat gắn với yếu tố đáp ứng hoạt hóa *trans* (*trans*-activation response –TAR). Yếu tố TAR tương ứng với một cấu trúc vòng gốc của RNA có trong trình tự dẫn không được phiên dịch của tất cả các bản phiên mã của HIV, gồm cả hệ gen RNA cần cho chức năng Tat của HIV-1. Sự tương tác giữa Tat và TAR có thể dẫn tới sự hoạt chuyển mạnh (tăng biểu hiện các gen virus tới 1000 lần so với mức biểu hiện ở các thể đột biến HIV-1 không có gen *tat* do cảm ứng khởi đầu sự phiên mã và/hoặc kéo dài).

Một protein điều hòa quan trọng thứ hai là Rev, nó được tạo ra bởi gen *rev*. Protein Rev được tổng hợp sớm ở pha (pha) sao chép của HIV và tương tác với một vùng gồm 234 nucleotide khung đọc mở của *env* trong mRNA gọi là yếu tố đáp ứng Rev (Rev response element –RRE). Sự tương tác của protein Rev với RRE làm tăng đáng kể sự xuất khẩu từ nhân mRNA virus không ghép nối và ghép nối đơn. Các RNA này mã cho các protein cấu trúc. Việc sản xuất protein Rev là đòi hỏi tuyệt đối cho sự sao chép của HIV, vì các thể đột biến của protein Rev không có khả năng cảm ứng tổng hợp các protein cấu trúc virus nên có sự khiếm khuyết sao chép.

Thành viên cuối cùng của họ protein điều hòa là protein Nef. Vai trò của protein Nef trong chu kỳ sao chép HIV-1 vẫn chưa rõ. Tuy nhiên, các sản phẩm của gen *nef* lại không cần cho sự sao chép HIV *in vitro* hoặc SIV *in vivo*. Rõ ràng là gen *nef* giữ vai trò điều hòa xuống sự biểu hiện gen CD4 trong các tế bào thâm nhiễm. Cũng có giả thuyết cho rằng Nef có liên quan tới khả năng dập tắt sự sinh trưởng và cư trú lặng lẽ trong hệ gen tế bào chủ của HIV-1.

Hơn nữa, Gag, Pol và Env – các sản phẩm gen muộn được mã bởi HIV lại có cả các protein sinh trưởng Vif, Vpu và Vpr. Cả Vif (yếu tố thâm nhiễm virion –virion infectivity factor) và protein Vpu (protein U của virus- viral protein U) giữ vai trò sinh trưởng và sản xuất các hạt virion HIV thâm nhiễm. Protein Vpr (viral protein R) vừa mới được mô tả gần đây giữ vai trò hợp nhất, làm ngừng lại chu kỳ tế bào của các tế bào thâm nhiễm HIV. Vì sự biểu hiện đơn lẻ Vpr cũng đủ để làm ngừng chu kỳ tế bào ở pha chuyển đổi G2/M của chu kỳ

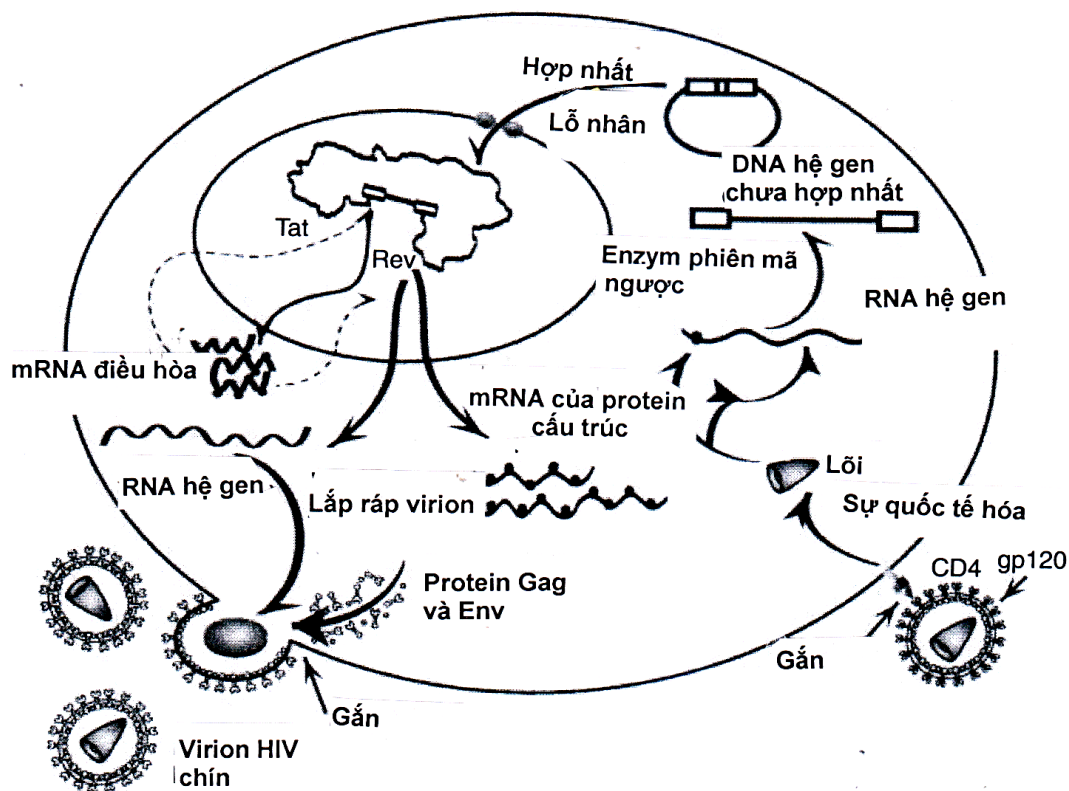
tế bào, vì thế các tế bào thâm nhiễm HIV không có khả năng tiến triển một cách bình thường từ pha G2 của chu kỳ tế bào thông qua phân bào có tơ để hoàn tất chu kỳ tế bào. Nếu chu kỳ tế bào được dừng sau thâm nhiễm HIV sẽ gây nên hiện tượng các tế bào bị thâm nhiễm vẫn ở trạng thái hoạt động vì thế mà sản sinh một lượng tối đa virus từ các tế bào bị thâm nhiễm.

14.3 Chu kỳ sống (vòng đời) và bệnh lý học của thâm nhiễm HIV

Trên Hình 14.3 cho thấy, giai đoạn khởi đầu của sự thâm nhiễm (pha sớm) bắt đầu bằng việc gắn protein gp 120 của virus vào receptor bề mặt tế bào của nó - protein CD4. CD4 tập trung cao trên bề mặt các tế bào lympho máu ngoại biên (peripheral blood lymphocytes -PBL) và thưa hơn trên các tế bào khác có thể bị thâm nhiễm HIV như các tế bào đơn nhân, đại thực bào và các tế bào nhánh thần kinh (dendritic). Tuy nhiên, CD4 không phải là thành phần trung gian duy nhất của thâm nhiễm HIV. Những công trình trước đây cho thấy các dòng tế bào chuột biểu hiện CD4 người nhưng không bị nhiễm bởi HIV, điều đó được giả định là có tồn tại một đồng yếu tố (co-factor) đặc hiệu người. Đồng yếu tố này có tên là fusin (CXCR4) là một đôi hỏi tuyệt đối cùng với CD4 để HIV vào được các tế bào người. Fusin là một glycoprotein hợp nhất màng và là một thành viên của họ receptor chemokine. Một vài protein đồng yếu tố (CXCR4, CCR5 và CCR3) hiện nay đã xác định được trên nhiều tế bào khác nhau. Nhờ gắn với protein vỏ gp120/gp41 của HIV nên đã cảm ứng thay đổi cấu trúc tế bào, cho phép chúng tương tác với đồng yếu tố này, tiếp đó là sự hòa virus vào màng sinh chất tế bào chủ. Nucleocapsid của HIV-1 được “hòa nhập” vào trong tế bào chất ở những nơi mà hệ gen virus chưa được bọc áo. Hệ gen RNA được phiên mã ngược thành một DNA chuỗi đơn (-) bởi protein RT mã bởi trình tự *pol*. Ribonuclease mã hóa virus sau đó sẽ phân giải RNA hệ gen. Enzyme RT sau đó lại mã cho chuỗi (+) thứ hai của DNA và hệ gen virus chuỗi kép này sẽ gửi thông tin và được vận chuyển qua lỗ nhân để vào trong nhân các tế bào thâm nhiễm. Hệ gen DNA virus được tổng hợp mới này sau đó hợp nhất ngẫu nhiên vào hệ gen tế bào chủ bởi protein integrase mã hóa virus. Dạng hợp nhất này của virus được biểu thị như là provirus. Provirus có thể được sao chép ngay tức khắc hoặc ở trạng thái tiềm tàng lâu dài và cách thức này cũng được truyền cho các tế bào con cháu của các tế bào gốc thâm nhiễm.

Mặc dầu cơ chế hoạt hóa provirus vẫn chưa rõ, nhưng có lẽ provirus được hoạt hóa ở giai đoạn trung gian khi bắt đầu thâm nhiễm virus. Sự hoạt hóa đã làm cảm ứng phiên mã nhiều RNA ghép nối của virus - chúng được sử dụng để tổng hợp các protein Tat và Rev, tác động như các protein điều hòa mạnh khi sao chép virus. Như đã đề cập ở trên, protein Tat tăng cường kéo dài phiên mã của RNA virus trong nhân các tế bào thâm nhiễm. Trong khi đó, protein Rev lại tăng cường xuất khẩu từ nhân các mRNA virus không ghép nối và ghép nối đơn, các RNA này mã cho các protein cấu trúc virus.

Pha muộn của sự thâm nhiễm HIV bắt đầu với việc tích tụ một lượng lớn protein cấu trúc. Pha muộn bao gồm sự lắp ráp các hạt virus có 2 bản phiên mã của hệ gen RNA virus. Các hạt đã lắp ráp sẽ được chuyển tới màng tế bào, ở đó các hạt virus chín đằm sẽ hồi ra khỏi màng sinh chất. Theo lý thuyết, chu kỳ sống của virus HIV-1 có thể bị gián đoạn do bị ngăn trở hoặc bị ức chế chức năng một hoặc nhiều protein “chìa khóa” của virus hoặc các yếu tố điều hòa tác động *cis* của chúng.



Hình 14.3 Chu kỳ sống và sự sao chép của HIV-1.

HIV có thể giết chết các tế bào lympho CD4+ bị thâm nhiễm theo 2 cách. Vì các virus con cháu đâm chồi khỏi màng tế bào nên protein vỏ ngoài gp120 sẽ phản ứng với các phân tử CD4 có trên bề mặt các tế bào thâm nhiễm, phá vỡ sự hợp nhất của màng tế bào trong những vùng tập trung cao CD4. Khi phá vỡ màng sẽ làm chết các tế bào thâm nhiễm. Mặt khác, một tế bào bị thâm nhiễm cũng có thể tương tác với các tế bào chưa bị thâm nhiễm qua protein vỏ của HIV cắm sâu vào màng trên bề mặt tế bào của chúng. Sự tương tác này được lặp lại thông qua các phân tử CD4+ có trên bề mặt các tế bào chưa bị thâm nhiễm. Vì có sự điều hòa tế bào nên hàng trăm tế bào CD4 có liên quan tới việc hình thành các dạng hợp bào lớn. Tất cả các tế bào này hòa trong hợp bào chết và vì thế hiệu ứng bệnh lý tế bào của HIV có thể được mở rộng ra ngoài các tế bào thâm nhiễm trực tiếp với virus. Rõ ràng là có 2 cơ chế làm mất các tế bào lympho CD4+ xảy ra ở các bệnh nhân thâm nhiễm HIV. Hậu quả của sự thâm nhiễm HIV ở các dòng tế bào đơn nhân - đại thực bào vẫn chưa rõ. Có vấn đề là virus có thể được sao chép nhưng lại không gây hiệu ứng bệnh lý tế bào đối với các tế bào lympho T. Cũng tương tự như các tế bào T thâm nhiễm, sự hình thành hợp bào đa nhân của các tế bào giống đại thực bào cũng thấy ở các mô thâm nhiễm HIV. Các đại thực bào này có chứa virus sao chép nhưng có thể chưa bị hủy hoại nhưng rõ ràng là đã mất chức năng.

(Theo Bruce Bunnell. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

14.4 Những cách tiếp cận nhằm ức chế sự sao chép của HIV

Cách tiếp cận GTL đối với HIV có thể chia thành 3 cấp lớn: (1) dùng các protein không *trans* trội hoặc là các kháng thể chuỗi đơn, (2) GTL trên cơ sở acid nucleic và những phân tử bán phần gồm các antisense DNA/RNA, các bẫy RNA và các bán phần RNA xúc tác (ribozyme) và (3) trị liệu miễn dịch với việc sử dụng các vaccine công nghệ gen hoặc các tế bào lympho đặc hiệu với tác nhân gây bệnh (bảng 14.1). Xa hơn nữa là tổ hợp các cách tiếp cận đã nêu trên để đồng thời ức chế nhiều giai đoạn của chu kỳ sống virus hoặc kết hợp với các cách tiếp cận khác như cấy ghép tế bào gốc tạo máu hoặc tiêm chủng. Trong phạm vi GTL, hiệu quả đạt được trong việc kháng HIV-1 là kết quả trực tiếp của một số yếu tố chủ chốt: (1) chọn lọc tế bào đích thích hợp cho GTL, (2) hiệu ứng của hệ thống chuyển gen trên tế bào đích, (3) tính ổn định của các sản phẩm gen kháng HIV và (4) khả năng ức chế sao chép virus bằng thực thể trị liệu.

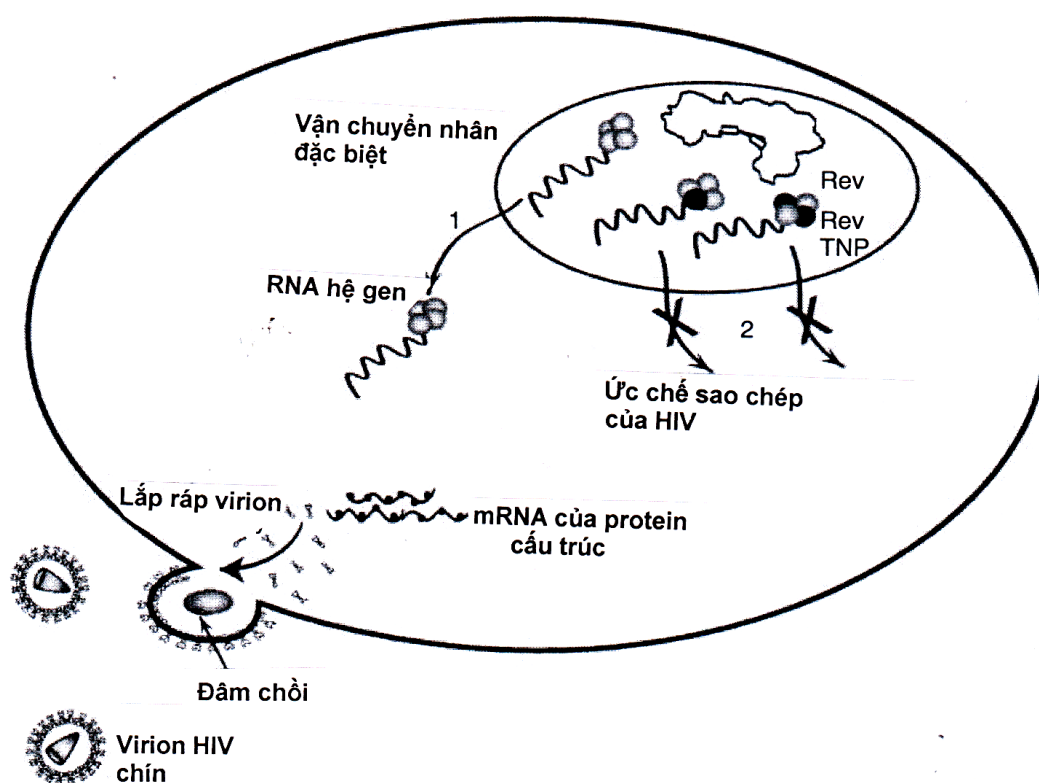
14.4.1 Những protein không *trans* trội

Những protein không *trans* trội (transdominant negative protein – TNP) là các phiên bản đột biến về điều hòa hoặc các protein cấu trúc biểu hiện kiểu hình (-) trội, ức chế sự sao chép của HIV. Theo định nghĩa, những thể đột biến như thế không những không có hoạt tính thể hoang dã mà còn ức chế cả chức năng của protein thể hoang dã có chung nguồn gốc dạng *trans*. Sự ức chế có thể xảy ra bởi vì thể đột biến này cạnh tranh cơ chất thiết yếu hoặc đồng yếu tố có khả năng giới hạn lớn hoặc làm cho protein hình thành các đa phức. Thể đột biến có thể kết hợp với các monomer hỗn hợp bất hoạt. Điểm hạn chế của việc sử dụng các protein virus *trans* trội là có thể sinh miễn dịch khi biểu hiện bởi các tế bào tải nạp. Những tế bào được bảo vệ có thể dần dần cảm ứng đáp ứng miễn dịch mà kết quả có thể lại làm phá hoại chính nó. Điều này có thể làm giảm hiệu lực của GTL kháng virus khi dùng các protein *trans* trội. Các protein điều hòa HIV-1 (tat và Rev) và các protein cấu trúc (Env và Gag) là các đích tiềm năng cho sự phát triển các TNP.

Bảng 14.4 Các chiến lược gen trị liệu nhằm ức chế sự sao chép của HIV

Chiến lược kháng HIV	Cách tác động tiềm ẩn
Các cách tiếp cận trên cơ sở protein	
<i>Protein không trans trội</i>	
Rev	Xuất khẩu nhân của mRNA virus
Tat	Phiên mã/xử lý hệ gen virus
Gag	Lắp ráp virus
Env	Lắp ráp virus
<i>Protein nội sinh</i>	
CD4 hòa tan	Receptor gắn/ lắp ráp virus
CD4-KDEL	Bẫy Env và Rev trong ER
E1F-5A	
<i>Kháng thể chuỗi đơn (intrabody)</i>	
kháng gp 120	Làm chín và tạo chức năng cho protein Env
<i>Cách tiếp cận cơ sở acid nucleic</i>	
<i>AntisenseRNA</i>	
Antisense Tat/Rev	Phiên dịch protein Tat và Rev
Antisense Gag	Phiên dịch protein Gag
<i>Ribozyme</i>	

Trình tự dẫn 5'	Phiên dịch RNA virus
Multitarget (đa đích)	Phiên dịch RNA virus
<i>Antisense oligonucleotide</i>	
Bẫy RNA	Phiên dịch RNA virus
Bẫy TAR	Phiên mã/xử lý hệ gen virus
Bẫy RRE	Xuất khẩu nhân của mRNA virus
Tăng cường miễn dịch	
Env	Cảm ứng đáp ứng miễn dịch TB và thể dịch
CTL đặc hiệu virus	Tăng hoạt tính độc tế bào đối với HIV



Hình 14.4 Hoạt động của protein Rev không trans trội. (1) chức năng bình thường của protein Rev là hình thành các phức hợp multimer làm tăng hiệu ứng vận chuyển ngoài nhân của RNA hệ gen virus và (2) protein Rev không trans trội hình thành các phức hợp multimer hỗn hợp bất hoạt với protein Rev hoang dã. Phức hợp Rev bất hoạt này can thiệp vào chức năng bình thường của các phức hợp Rev hoang dã và ức chế sự vận chuyển ngoài nhân của RNA HIV ghép nối đơn và không ghép nối.

(Theo Bruce Bunnell. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

TNP được xem xét kỹ lưỡng nhất là protein Rev đột biến - RevM10. Protein Rev là một TNP trải qua hàng loạt đột biến ở gen *rev* (hình 14.4). RevM10 vẫn còn khả năng multimer hóa (multimerized) và gắn vào RRE, nhưng do kết quả của các đột biến này mà protein

RevM10 không còn tương tác một cách hiệu quả với đồng yếu tố tế bào để hoạt hóa chức năng Rev. Các dòng tế bào biểu hiện một cách ổn định RevM10 đã được bảo vệ khỏi sự thâm nhiễm HIV trong các thí nghiệm nuôi cấy tế bào dài hạn. Sự tải nạp REvM10 trong các dòng tế bào T hoặc PBL sơ cấp sẽ làm chậm lại sự sao chép virus và không thấy bất kỳ hiệu ứng âm tính nào trên các tế bào này. Gần đây, người ta đã chứng minh rằng RevM10 ức chế sao chép của HIV-1 ở các tế bào thâm nhiễm mạn tính.

Một protein TNP Rev khác được phát triển bởi Morgan và cộng sự (1994) ức chế sự sao chép HIV trong các dòng tế bào T và PBL ở phòng thí nghiệm cũng như HIV phân lập được trên lâm sàng. Dạng thứ ba của Rev TNP được tạo ra bằng cách loại bỏ trình tự tín hiệu định vị nhân. Trình tự này có chức năng như một tín hiệu định hướng protein Rev vào vùng nhân các tế bào thâm nhiễm. Rev TNP này được giữ trong tế bào chất và ngăn ngừa sự định vị của Rev hoang dã vào nhân do hình thành các oligomer bất hoạt.

Protein Tat điều hòa HIV cũng được dùng để tạo các TNP. Tat TNP được gây đột biến ở domain gắn protein của nó. Để tải nạp vào những dòng tế bào T thì Tat TNP phải ức chế sự sao chép HIV trong 30 ngày. Qua cơ chế này cho thấy chức năng của Tat TNP là do cô lập một yếu tố tế bào có liên quan tới sự hoạt chuyển qua trung gian Tat. Điều thú vị là, trong nghiên cứu này đã phát triển được một vec tơ retrovirus có khả năng biểu hiện được cả Tat và Rev TNP. Vec tơ multi-TNP ngăn chặn sự sao chép HIV-1 hiệu lực hơn các vec tơ retrovirus chỉ biểu hiện TNP hoặc Rev đơn lẻ. Nghiên cứu này đã chứng minh rằng sự ức chế của Tat và Rev xảy ra một cách đồng thời có thể làm cho GTL HIV hiệu lực hơn. Gần đây, một protein hòa trộn *trans* trội kép Tat/Rev là Trev đã được thiết kế nhằm ức chế đồng thời 2 hoạt tính thiết yếu của HIV-1. Để thâm chuyển hoặc tải nạp gen *Trev* vào trong các tế bào T thì các tế bào này phải tránh được các hiệu ứng bệnh lý tế bào của HIV. Sự ức chế đồng thời 2 chức năng của HIV sẽ cho các ưu thế vượt trội hơn TNP đơn chức năng. Các bản phần TNP cơ sở protein cấu trúc cũng được xem xét cho chức năng kháng HIV-1. Các protein cấu trúc (Gag và Env) được oligomer hóa thành các phức hợp multimer khi lắp ráp virus. Sự multimer hóa tạo chúng thành các ứng cử viên của các thể hệ TNP. Một Gag TNP cũng được xem xét và thấy tất cả đều có khả năng ức chế sự sao chép HIV. Chức năng của Gag TNP là làm ngừng các giai đoạn của chu kỳ sống virus chẳng hạn như sự lắp ráp, sự đâm chồi, sự lột áo của hệ gen virus hay sự khởi đầu phiên mã ngược. Do mức độ phiên mã di truyền chậm của các gen *gag* khi vắng mặt protein Rev của HIV nên việc ứng dụng Gag TNP bị hạn chế. Tuy nhiên, nếu sự biểu hiện Gag đột biến mức độ thấp thì sẽ không đủ hiệu lực ngăn cản sự sao chép của HIV-1. Env TNP cũng đã được tổng hợp nhưng những test khởi đầu cho thấy hoạt tính kháng virus vẫn còn thấp.

14.4.2 Các kháng thể chuỗi đơn (intrabody)

Một lớp mới hơn của GTL kháng vi khuẩn là các kháng thể chuỗi đơn biểu hiện trong tế bào (cũng còn gọi là intrabody). Đoạn chuỗi đơn có thể biến đổi được của một kháng thể là domain cấu trúc nhỏ nhất nắm giữ tính đặc hiệu kháng nguyên toàn phần và có khả năng gắn vào vị trí của kháng thể mẹ (parental). Các kháng thể chuỗi đơn được tạo bởi sự phân dòng các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ một thể lai biểu hiện kháng thể của một protein đích đặc hiệu. Những gen này biểu hiện nội bào các kháng thể chuỗi đơn, gồm các trình tự Ig chuỗi nặng mà đích trong cơ thể là lưới nội chất (endoplasmic reticulum –ER) và vùng có thể biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đã được sắp xếp lại, chúng được nối với nhau bởi một bộ kết nối (linker) linh hoạt trong chuỗi. Vì kháng thể chuỗi đơn không

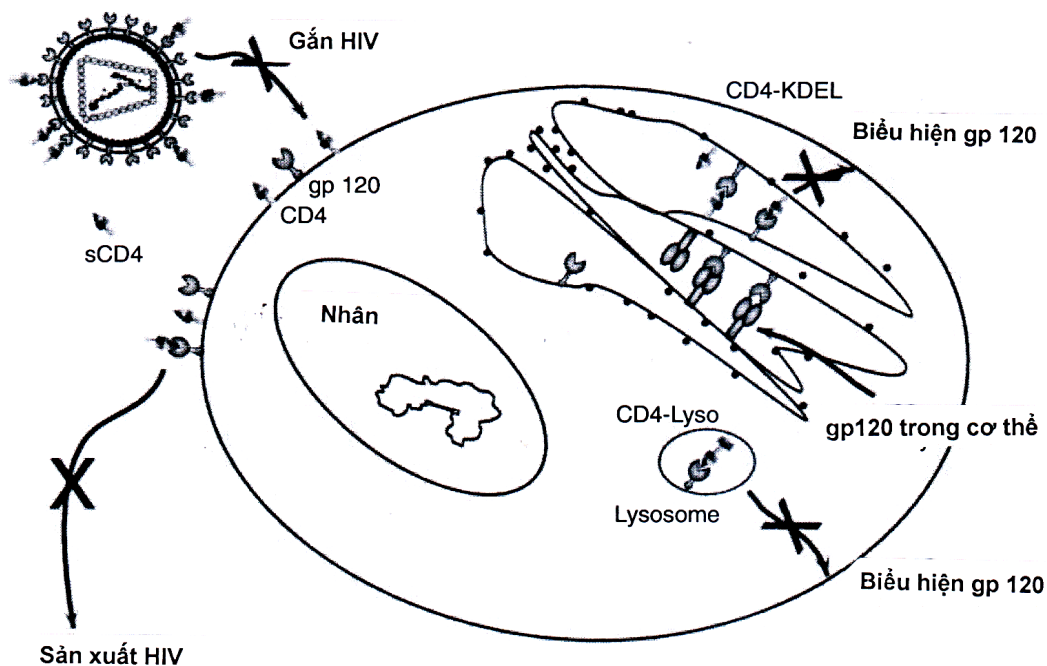
được bài xuất nên nó chỉ có hiệu ứng trong lưới nội chất, có thể thông qua tương tác của nó với protein BiP đặc hiệu ER. Protein BiP gắn không hoàn toàn với các Ig gấp nếp và có thể tạo thuận lợi cho sự gấp nếp và/ hoặc sự oligomer hóa của những protein này. Intrabody có thể trực tiếp gắn và ngăn chặn chức năng gen hoặc có thể cô lập protein ở những khoang tế bào không thích hợp và làm ngừng chu kỳ sống của HIV.

Sự biểu hiện của intrabody đặc hiệu vùng gắn CD4 của HIV-1 gp 120 (Env) làm giảm đáng kể sự sao chép HIV-1 do bẫy gp 160 trong ER và ngăn ngừa sự chín của protein gp120/gp41. Các intrabody cho các protein Rev thì bẫy Rev ở khoang tế bào chất và ngăn chặn sự biểu hiện HIV-1 do ức chế sự xuất khẩu RNA của HIV-1 từ nhân. Hơn nữa, người ta đã phát triển các intrabody chứa các trình tự tín hiệu định vị nhân SV40 cho Tat. Các kháng thể chuỗi đơn kháng Tat ngăn chặn sự hoạt chuyển qua trung gian Tat của HIV-1 LTR và làm cho các dòng tế bào T kháng lại sự thâm nhiễm HIV-1.

14.4.3 Các protein tế bào nội sinh và các tác nhân kháng HIV

Protein từ các tế bào được xác định được là có hoạt tính ức chế gen đặc hiệu (Hình 14.5). Hoạt tính này có thể tác động bằng cách ngăn ngừa sự gắn kết HIV với tế bào, hoặc bằng trực tiếp với các protein điều hòa/cấu trúc, hoặc gián tiếp bởi cảm ứng kiểm chế các yếu tố tế bào có ảnh hưởng tới sự biểu hiện gen virus. Một trong số các thí nghiệm *in vitro* thành công nhất với việc sử dụng các protein tế bào nội sinh để ức chế tác nhân thâm nhiễm là việc sử dụng một phiên bản hòa tan của HIV receptor CD4 (sCD4). Chức năng kháng nguyên CD4 của tế bào T trợ giúp như là một receptor cho HIV thông qua sự tương tác vật lý của glycoprotein vỏ HIV là gp120 với protein CD4. Dựa trên các kết quả này, các nhà nghiên cứu đã chứng minh rằng các protein (sCD4) có thể được gắn một cách hiệu lực để ức chế sự thâm nhiễm trong các tế bào CD4+. Hiệu ứng của chiến lược này là sự cạnh tranh gắn kết của HIV với CD4 tế bào và nồng độ cao của các sCD4. Muốn chiến lược này có hiệu quả đòi hỏi phải có sự biểu hiện liên tục các sCD4 ở mức cao. Các vec tơ retrovirus biểu hiện sCD4 có thể bảo vệ được các dòng tế bào T khỏi sự thâm nhiễm HIV *in vitro*. Giới hạn lớn của chiến lược này là khả năng đạt được sự biểu hiện đủ cao của sCD4 để trung hòa HIV một cách hiệu quả. Việc sử dụng sCD4 cho GTL với thâm nhiễm HIV trong lâm sàng vẫn chưa thu được kết quả khả quan. Truyền qua tĩnh mạch các protein sCD4 tái tổ hợp cho các bệnh nhân thâm nhiễm HIV cũng không thấy có hiệu lực trong các thử nghiệm trên lâm sàng ở pha I. Ngược lại, đối với các nòi virus HIV trong phòng thí nghiệm thì thấy hiệu ứng rõ rệt của các protein CD4 hòa tan.

Một thay đổi trong cách tiếp cận GTL kháng HIV cơ sở CD4 là phát triển phân tử CD4 hòa tan đột biến có chứa tín hiệu duy trì ER đặc hiệu (Lys-Asp-Glu-Leu hoặc KDEL). Phân tử lai này ngăn chặn sự bài xuất gp120 và sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của gp120/41 được giữ trong lưới nội chất, vì thế phòng ngừa được sự chín của các hạt HIV-1 thâm nhiễm. Người ta cũng chứng minh rằng những đột biến này sẽ làm giảm ái lực của CD4 với gp120, do đó tạo được phần nào khả năng cho CD4 – KDEL giữ gp120 ở lưới nội chất. Một cách tiếp cận tương tự là phức hợp CD4/gp160 hòa tan đích đặc hiệu cho lysosome thông qua sự hợp nhất các domain đích của lysosome trong CD4 hòa tan. Các phức hợp domain lysosome CD4/gp160 sẽ được phân giải trong lysosome của tế bào và sự sản xuất các hạt HIV chín sẽ được giảm bớt.



Hình 14.5 Các cách tiếp cận trên cơ sở protein tế bào đối với sự ức chế sao chép của HIV-1. Việc sản xuất một protein CD4 hòa tan nội bào có thể ngăn chặn được cả sự gắn kết của các hạt HIV thâm nhiễm cũng như việc sản xuất ra các hạt virus mới từ các tế bào bị thâm nhiễm bằng cách làm trung hòa toàn bộ protein lớp vỏ. Gắn một tín hiệu duy trì lưới nội chất (KDEL) với protein CD4 sẽ dẫn đến ức chế sự sao chép của virus do phức hợp vỏ gp160 được giữ lại ở lưới nội chất. Sự hợp nhất của trình tự đích lysosome với protein CD4 dẫn đến ức chế sự biểu hiện gp160 thông qua sự phân giải đích trong lysosome. Sự biểu hiện của các kháng thể chuỗi đơn (intrabody) có thể dẫn đến việc duy trì protein virus trong lưới nội chất do sự tương tác với protein BiP. (Theo Bruce Bunnell. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

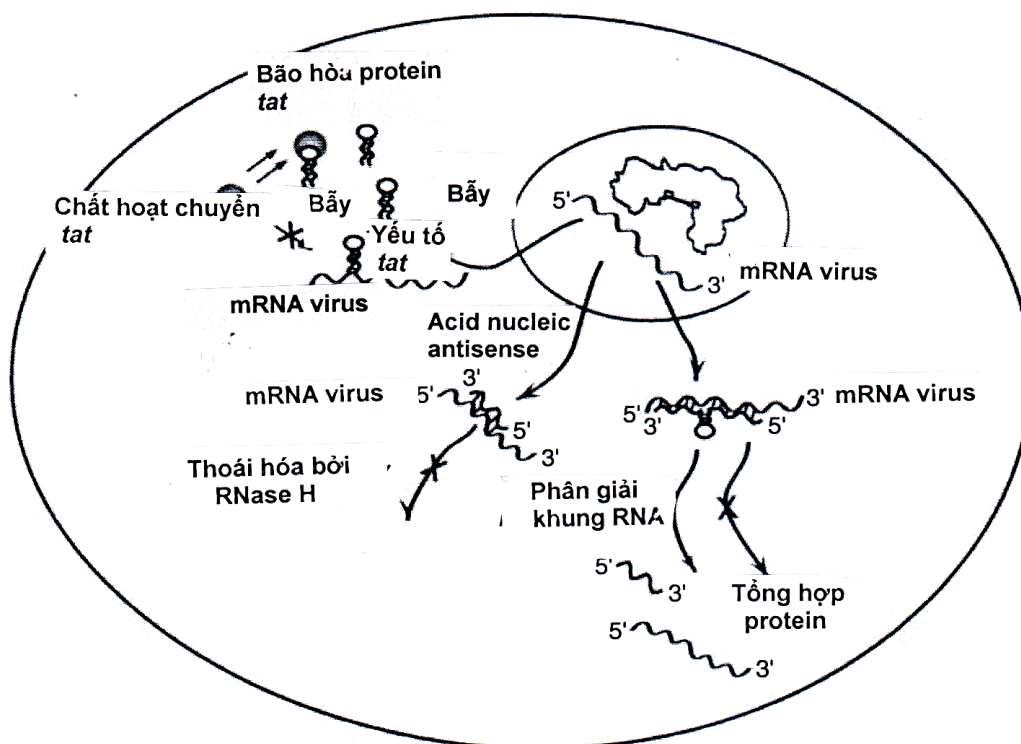
Vừa mới đây người ta đã chứng minh rằng protein Rev tương tác đặc hiệu với các yếu tố của tế bào để tạo chức năng bình thường trong tế bào thâm nhiễm. Các yếu tố khởi đầu 5A (eIF-5A) của tế bào nhân thực là một yếu tố phiên mã tế bào, nó tương tác với Rev bằng cách gắn vào domain hoạt hóa Rev. Sự tương tác giữa các thể đột biến của eIF-5A và Rev có thể ức chế một cách hiệu lực sự sao chép HIV-1 *in vitro*. Ứng dụng sự tương tác giữa các yếu tố tế bào và HIV có thể bổ sung thêm các cách tiếp cận GTL với HIV. Vì là các protein tế bào nội sinh nên chúng không có tính kháng nguyên, bởi vậy các tế bào được công nghệ hóa với các gen ức chế tế bào này có thể không bị loại trừ bởi hệ miễn dịch của bệnh nhân. Đây là một lợi thế so với việc sử dụng các gen mã cho các protein virus *trans* trội - các protein sinh miễn dịch tiềm tàng cho GTL.

Một chiến lược mới lại khai thác sự tương tác của CD4/fusin với protein gp120/gp41 của virus HIV. Nhờ trình tự sao chép HIV của các tế bào thâm nhiễm nên biểu hiện được protein vỏ gp120/gp41 trên bề mặt của chúng để thực hiện việc lắp ráp các hạt virus mới. Sự biểu hiện của gp120/gp41 trên bề mặt tế bào dẫn các nhà khoa học tới giả thuyết rằng virus có thể được công nghệ hóa để có các receptor HIV và các đồng

receptor (co-receptor) ở lớp vỏ thay cho các protein vỏ virus nội sinh. Thế hệ virus lai này là đích đặc hiệu đối với các tế bào thâm nhiễm mà ở đó sự sao chép của virus sẽ làm các chết tế bào. Một loại virus gây bệnh ở miệng (vesicular stomatitis virus-VSV) cũng đã được công nghệ hóa bằng cách này. Trong các nghiên cứu với VSV, người ta đã loại bỏ gen VSV và thay bằng các gen của CD4 và CXCR4, kết quả là hình thành các hạt VSV tái tổ hợp thâm nhiễm đặc hiệu với các tế bào đã thâm nhiễm HIV.

14.5 Các cách tiếp cận GTL với cơ sở acid nucleic

14.5.1 Bẫy RNA



Hình 14.6 Gen trị liệu HIV- 1 với cơ sở acid nucleic. Các gen kháng HIV-1 có thể được biểu hiện trong ngữ cảnh của các antisense acid nucleic như antisense oligonucleotide, antisense RNA hoặc ribozyme. Tất cả các antisense này đều thúc đẩy sự phân giải các trình tự đích bởi RNase hoặc ngăn chặn sự phiên dịch của mRNA. Chức năng của ribozyme là do sự tương tác đặc hiệu với một trình tự đích trong RNA và sự bất hoạt chức năng là do sự cắt nhỏ bộ khung phosphodiester. Sự biểu hiện quá mức các phân tử RNA ngăn (bẫy) tương xứng các yếu tố tác động cis của virus. Các yếu tố đáp ứng hoạt chuyển (TAR) hoặc yếu tố đáp ứng Rev (RRE) sẽ ức chế sự liên kết của protein virus với các trình tự cùng nguồn gốc cũng thấy trên các mRNA virus.

(Theo Bruce Bunnel. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Cách tiếp cận này là phá vỡ sự tương tác bình thường của các protein điều hòa HIV với các yếu tố điều hòa tác động cis thông qua việc biểu hiện quá mức các phân tử RNA ngăn

(bẫy), các phân tử này sẽ cạnh tranh với các yếu tố RNA virus dành cho việc gắn các protein cần cho sự sao chép của virus (hình 14.6). Yếu tố đáp ứng hoạt chuyển (transactivation response – TAR) và các yếu tố đáp ứng Rev (Rev response element - RRE) là 2 yếu tố điều hòa virus có ở HIV và là các vị trí gắn cho các protein hoạt chuyển Tat và Rev. Hoạt tính kháng virus của các bẫy TAR đã được kiểm tra bằng sự chuyển gen qua trung gian virus vào các dòng tế bào T *in vitro*. Tuy nhiên, nếu biểu hiện quá mức bẫy TAR sẽ làm ức chế sự hoạt hóa phiên mã qua trung gian protein Tat, protein này làm giảm đáng kể sự sao chép của HIV phân lập ở phòng thí nghiệm. Ức chế sao chép virus của bẫy TAR là do giảm sự gắn kết của protein Tat vào các yếu tố TAR nội sinh, các yếu tố này ức chế sự hoạt hóa phiên mã cần cho sự sao chép virus. Sự biểu hiện của bẫy TAR lặp nối tiếp gồm khoảng 50 đoạn lặp TAR sẽ ức chế hiệu quả sự sao chép của HIV-1 cả trong các dòng tế bào T cũng như các dòng tế bào lympho sơ cấp. Xa hơn nữa, bẫy TAR multimer hóa cũng ức chế tốt sự sao chép virus trong các tế bào lympho từ các bệnh nhân AIDS giai đoạn muộn.

Sự biểu hiện tăng cường các bẫy RRE bởi các vec tơ retrovirus dẫn đến ức chế dài hạn sao chép HIV trong các dòng tế bào T ở người. Các bẫy RRE có được chức năng là do ngăn ngừa sự gắn kết của Rev với trình tự RRE bình thường, những trình tự này làm giảm mức mRNA của HIV-1 không ghép nối và ghép nối đơn được xuất ra từ nhân của các tế bào thâm nhiễm. Rõ ràng là sự biểu hiện quá mức các bẫy RRE sẽ làm kháng mạnh virus. Nhưng còn một số vấn đề liên quan như hiệu ứng dài hạn của sự biểu hiện các bẫy RNA liệu có giữ được các chức năng bình thường của tế bào hay không? Hơn nữa, đối với các protein virus thì cả TAR và RRE đều gắn với các đồng yếu tố tế bào, vì thế sự biểu hiện quá mức của các bẫy có thể gây hiệu ứng âm về khả năng sống đơn độc hoặc các hoạt tính thông qua sự cô lập của các protein cần cho các chức năng bình thường của tế bào. Để giới hạn sự tương tác giữa bẫy RRE và các protein tế bào, người ta đã thử dùng một bẫy RRE nhỏ chỉ có 13 nucleotide nhưng vẫn có domain gắn Rev. Bẫy RRE nhỏ này cho thấy ức chế một cách hiệu quả sự sao chép của HIV-1 *in vitro*.

14.5.2 Antisense DNA và RNA

Công nghệ antisense acid nucleic bao hàm nhiều phương pháp, tất cả đều hướng trực tiếp tới việc “làm câm” (silencing) đặc hiệu sự biểu hiện gen. Việc làm câm biểu hiện gen thu được thành quả là thông qua việc đưa vào tế bào hoặc mô antisense RNA hoặc các bán phần DNA chuỗi đơn (oligodeoxynucleotide) bổ cứu cho mRNA đích (Hình 14.6). Theo lý thuyết, trong antisense acid nucleic thì cặp base acid nucleic của Watson- Crick được dùng để khóa sự biểu hiện gen trong một mẫu (fashion) đặc hiệu trình tự. Một trong số các nghiên cứu trọng lượng nhất hướng tới việc áp dụng antisense RNA là đưa thêm vào các oligonucleotide DNA đã có cải biến hóa học để làm tăng tính ổn định của chúng trong tế bào. Nhiều antisense oligonucleotide tổng hợp đã được thiết kế nhằm ức chế sự sao chép của HIV-1. Tuy nhiên, việc sử dụng chúng để ức chế HIV-1 thì vẫn còn bị giới hạn cực kỳ bởi vì sự hấp thu của các oligonucleotide tự do từ môi trường ngoài tế bào *in vivo* vẫn còn vô vàn trở ngại và hệ thống chuyển giao hiệu lực vẫn chưa được sắp đặt. Các bán phần oligonucleotide cũng vậy, nó được “hòa nhập” vào trong các tế bào đích và cuối cùng được phân giải bởi các enzyme tế bào sao cho bất kỳ hoạt động ức chế nào đối với sự biểu hiện gen cũng chỉ là nhất thời. Còn một vấn đề nữa đối với việc sử dụng oligonucleotide DNA là việc ức chế gen lại thường không đặc hiệu. Nói cách khác, ức chế

biểu hiện thường không phải là kết quả trực tiếp của sự tương tác giữa các oligonucleotide và trình tự đích mà là tương tác với RNA rất không đặc hiệu.

Một cách tiếp cận khác về ức chế biểu hiện gen qua trung gian antisense acid nucleic là đưa vào trực tiếp hoặc sản xuất nội bào antisense RNA trong các tế bào hoặc mô của các cơ quan. Việc đưa trực tiếp các bản phiên mã RNA vào trong các tế bào có thể được hoàn tất thông qua vi tiêm một sản phẩm phiên mã *in vitro* hoặc là một oligonucleotide đã cải biến hóa học. Việc theo dõi trực tiếp các bản phiên mã antisense RNA *in vivo* có thể là vô lý đối với GTL vì có rất nhiều tế bào cần nhận RNA trị liệu.

Một quan điểm khác đối với việc chuyển giao antisense RNA trong GTL là dùng các hệ thống vec tơ tạo ra antisense RNA trong tế bào hoặc mô của các cơ quan. Các hệ thống vec tơ virus tái tổ hợp thông thường nhất như retrovirus đã được sử dụng bởi vì chúng nhắm đích một cách hiệu quả tới nhiều tế bào. Việc sử dụng các hệ thống vec tơ cơ sở retrovirus để sản xuất nội bào antisense RNA đã tạo thêm lợi thế. Điều đó có nghĩa là vec tơ này hợp nhất được vào hệ gen tế bào chủ và vì thế antisense có hiệu ứng kéo dài hơn oligonucleotide. Tương tự như vậy, việc sử dụng các promoter có thể điều hòa hoặc cảm ứng được sẽ cho phép kiểm soát chặt chẽ mức độ ức chế.

Mặc dầu cơ chế sự ức chế biểu hiện gen qua trung gian antisense vẫn chưa rõ hoàn toàn, nhưng có giả thuyết cho rằng cặp đôi RNA (antisense RNA và RNA đích) đều bị phân giải bởi RNase H hoặc do sự phiên mã kế tiếp mRNA bị ngăn chặn. Giới hạn của các bản phiên mã antisense RNA cũng giống như các quan sát thấy trên oligonucleotide. Với các mức biểu hiện cao hơn của các bản phiên mã antisense thì sự ức chế gen lại thường là không đặc hiệu. Sự biểu hiện antisense với mức cao và dài hạn là một nhu cầu đòi hỏi đối với việc ức chế hiệu quả sự sao chép virus. Cơ chế thông qua các bản phiên mã antisense ức chế sự biểu hiện gen đòi hỏi một phân tử antisense phải gắn được vào một phân tử đích. Sự hợp thức của các trình tự antisense với các trình tự đích phải là thấp nhất: 1/1 (antisense/đích), nhưng thực tế cho thấy với tỷ lệ 5/1 hoặc 10/1 sẽ dẫn tới việc ức chế biểu hiện gen hiệu quả hơn. Vì vậy sự biểu hiện gen antisense phải được định lượng sao cho cao hơn mức biểu hiện gen HIV-1 thì chiến lược GTL bằng antisense mới có hiệu lực. Các vec tơ GTL tiêu chuẩn có promoter pol II thường không tạo đủ mức trình tự antisense để ức chế sự sao chép virus. Để tháo gỡ vấn đề này phải phát triển các vec tơ có hệ thống promoter được cải biến. Vec tơ retrovirus có promoter pol III rõ ràng làm tăng đáng kể mức độ biểu hiện gen. Sự phiên mã của các RNA vận chuyển (tRNA) và các RNA nhân nhỏ (small nuclear RNA) –snRNA ở các tế bào nhân thực được kiểm soát bởi các promoter pol III. Promoter pol III là một tổ hợp (gồm 2 phần tách biệt). Điều lý thú là chúng có ở vị trí bắt đầu sự phiên mã. Điều đó có nghĩa là RNA polymerase III làm lùi lại sự khởi đầu phiên mã của gen pol III. Vec tơ retrovirus cơ sở pol-III biểu hiện antisense với trình tự TAR đã ức chế tốt sự sao chép HIV-1 *in vitro*. Cuối cùng, phối hợp sự biểu hiện antisense RNA với thâm nhiễm HIV-1 sẽ cho phép biểu lộ hiệu lực các trình tự antisense trong các tế bào sau khi bị thâm nhiễm. Như vậy có thể phát triển một vec tơ retrovirus trong đó LTR của HIV-1 được coi như một promoter. Vec tơ này cho phép biểu hiện hiệu quả các trình tự antisense trong các tế bào lympho sau khi bị thâm nhiễm HIV.

Có rất nhiều bản phiên mã antisense đã được thiết kế cho các vùng đích khác nhau của hệ gen HIV-1. Sự biểu hiện nội bào ổn định các bản phiên mã HIV-1 hiện nay là một phương pháp hiệu quả nhất, nhờ công nghệ antisense mà có thể ức chế được sự biểu hiện gen HIV. Có nhiều nghiên cứu cho thấy khi sử dụng các bản phiên mã antisense đối với các gen *tat*, *rev*, *vpu* và *gag* chỉ làm giới hạn hoạt tính kháng virus. Khi phân tích sâu về trình

tự gen antisense HIV thấy có các antisense nhắm tới 10 vùng khác nhau của hệ gen HIV và người ta đã so sánh được hiệu ứng kháng virus của các antisense này. Các trình tự gen antisense có hoạt tính kháng virus nhất nhắm vào vùng 1 kb trong gen *gag* và một trình tự đặc hiệu cho một đoạn của hệ gen 562-bp bao gồm các gen *tat* và *rev*. Phân tích xa hơn về hiệu ứng kháng virus của đoạn gen antisense *tat/rev* thì thấy nó ức chế mạnh sự sao chép HIV-1 ở các dòng tế bào T và CD4+ PBL sơ cấp, nhưng mất hiệu ứng bảo vệ đối với quần thể tế bào bảo vệ vì thấy có thêm nhiều hạt HIV thâm nhiễm ở quần thể này.

14.5.3 Ribozyme (antisense RNA xúc tác)

Ribozyme là các phân tử RNA có hoạt tính xúc tác. Chức năng của chúng là gắn với các bán phần RNA đích thông qua lai đặc hiệu trình tự antisense, nó làm bất hoạt bằng cách cắt nhỏ bộ khung phosphodiester ở một vị trí đặc hiệu (Hình 14.6). Hai lớp ribozyme nghiên cứu kỹ nhất là ribozyme cặp tóc (hairpin) và ribozyme đầu rền (hammerhead) (tên gọi theo lý thuyết cấu trúc bậc hai của chúng). Ribozyme hammerhead phân giải RNA ở trình tự nucleotide U-H (H = A, C hoặc U) do thủy phân liên kết 3', 5' phosphodiester. Ribozyme hairpin thì phân cắt ở vị trí C-U-G. Lợi thế nổi bật của ribozyme vượt hẳn các antisense RNA truyền thống là chúng không bị tiêu hao trong phản ứng phân cắt đích, vì thế một ribozyme đơn có thể làm bất hoạt được nhiều phân tử đích. Hơn nữa, ribozyme còn có thể được tạo ra từ chính các đơn vị phiên mã. Vì thế nhiều ribozyme hướng đích vào các vùng khác nhau của hệ gen có thể được hợp nhất trong cùng một vec tơ. Do đặc tính xúc tác độc quyền của chúng nên ribozyme có tiềm năng ức chế cao đối với sự biểu hiện ngay cả ở các nồng độ thấp. Ribozyme cũng có tính đặc hiệu trình tự lớn hơn antisense RNA bởi vì đích luôn phải khớp đúng với trình tự đích cho phép gắn. Hơn nữa, vị trí phân cắt phải ở phía phải trong đoạn antisense. Tuy nhiên, về mặt chức năng và phạm vi tác động xúc tác thì ribozyme thực sự có đích được RNA *in vivo* hay không thì vẫn chưa rõ. Tuy nhiên, một giới hạn tiềm ẩn đối với việc sử dụng ribozyme cho GTL đối với HIV-1 là vẫn còn bị giới hạn về hiệu lực vì lý do di truyền (vẫn có một tỷ lệ đột biến cao đi cùng với sự sao chép HIV-1). Nếu có bất kỳ biến đổi nào về liên kết hoặc vị trí phân cắt trong trình tự đích thì đòi hỏi ribozyme phải trở lại trạng thái bất hoạt hoàn toàn.

Nghiên cứu đầu tiên về ribozyme được thiết kế để ức chế HIV-1 là sự thâm chuyển một ribozyme hammerhead tới trình tự *gag* của virus trong nguyên bào sợi người biểu hiện kháng nguyên CD4. Trước những thách thức với HIV-1, các tế bào phải có khả năng làm giảm mức độ biểu hiện của các phân tử RNA *gag* có độ dài đầy đủ và làm giảm đáng kể mức protein p24 từ *gag*. Các ribozyme phát triển với đích là trình tự dẫn 5' của HIV tỏ ra ức chế mạnh sự sao chép của HIV-1 trong các dòng tế bào T và PBL. Những ribozyme này làm bất hoạt sự thu nhận RNA virus để hòa nhập vào hệ gen. Vì vậy, các ribozyme với đích ở trình tự dẫn 5' của HIV ngăn ngừa được sự thâm nhiễm HIV-1 dài hạn, có thể làm cho các tế bào chưa thâm nhiễm trở nên kháng vĩnh viễn với sự thâm nhiễm HIV-1. Điều lý thú là ribozyme này có thể có tiềm năng ức chế toàn cầu sự biểu hiện gen virus bởi vì tất cả RNA từ HIV-1 đều có trình tự dẫn. Các ribozyme đa đích cũng đã được phát triển trong đó mỗi ribozyme đơn có thể phân cắt được ở nhiều vị trí định sẵn trong hệ gen HIV-1. Các ribozyme đa đích với các vùng định sẵn của các trình tự *env* ức chế đặc hiệu lực sự sao chép của một số HIV-1 phân lập.

Các đơn vị phiên mã của ribozyme đủ nhỏ để một số ribozyme có thể hợp nhất được vào một vec tơ đơn, vì thế các ribozyme hướng đích tới một số vùng của HIV-1 có thể được chuyển giao trong cùng một tế bào. Sự ức chế sao chép HIV qua trung gian ribozyme cải biến sẽ thu được thành quả nếu phát triển được các ribozyme đồng vị trí với RNA đích HIV trong khoang tế bào.

Để làm test chiến lược này, người ta đã dùng một bản phiên mã có chứa tín hiệu đóng gói retrovirus thì thấy nó làm bất hoạt được RNA hệ gen MoMLV tổng hợp mới, được dùng trước khi lắp ráp các hạt, kết quả là làm giảm đáng kể sự giải phóng của các hạt.

14.6 Các cách tiếp cận nhằm kích thích đáp ứng miễn dịch đặc hiệu HIV

14.6.1 Các vaccine DNA

Một cách tiếp cận mới của GTL với cơ sở acid nucleic là ĐUMD đối với các protein tự nhiên của HIV được tổng hợp do chuyển giao DNA plasmid vào trong tế bào, nói cách khác là các vaccine cơ sở DNA. Những quan sát đầu tiên dẫn tới việc phát triển vaccine gen là sau khi tiêm vào cơ chuột DNA plasmid mã cho các gen dấu chuẩn thì nó được biểu hiện. Mặc dầu mức độ chuyển gen còn thấp, nhưng đã xác định được rằng plasmid được “hòa nhập” đã tồn tại được và biểu hiện được ở động vật. Sự sản sinh ĐUMD đối với các protein dấu chuẩn được mã bởi các plasmid được chứng minh nhờ việc sử dụng DNA plasmid được đưa vào da chuột bằng hệ thống chuyển gen sinh học của 2 nhóm nghiên cứu. Sự phát triển ĐUMD bảo vệ do tiêm chủng với vaccine gen được chứng minh đầu tiên khi tiêm vào cơ chuột DNA plasmid trần mã cho nucleoprotein nội tại của virus influenza. Hiệu ứng tiềm ẩn của sự tiêm chủng DNA vào các tế bào cơ sau gián phân đã được chứng minh ở chuột và các mô hình động vật được thâm nhiễm với vi khuẩn, virus hoặc với các ký sinh trùng gây bệnh. Nhân tố căn bản đối với các vaccine gen này là tạo được cả ĐUMD tế bào T gây độc tế bào đặc hiệu cũng như ĐUMD thể dịch. Theo lý thuyết thì có rất nhiều lợi thế với kỹ thuật tiêm chủng DNA, nó vượt hẳn các chiến lược vaccine truyền thống như: (1) dễ dàng sản xuất và pha chế các DNA plasmid. (2) sự biểu hiện của kháng nguyên dạng tự nhiên thường dẫn tới sản sinh cả các tế bào T giúp đỡ và T gây độc tế bào, (3) tính miễn dịch dài hạn đã mở ra tiềm năng giảm liều lượng của các vaccine cần để tạo được ĐUMD bảo vệ và (4) các tế bào không cần là các tế bào đích cũng được thâm nhiễm một cách bình thường bởi các tác nhân thâm nhiễm.

Những bất lợi tiềm ẩn của tiêm chủng DNA là: (1) những sự cố bất ngờ có thể xảy ra khi đưa DNA plasmid vào các dạng tế bào dự kiến, (2) sản sinh ra các kháng thể kháng DNA plasmid được dùng để tiêm chủng và (3) sự hợp nhất ngẫu nhiên của DNA được tiêm vào trong các tế bào đích có thể làm hoạt hóa một gen gây ung thư hoặc làm bất hoạt một gen kiểm chế tạo khối u do các tác nhân gây đột biến được cài vào.

Một cách tiếp cận chủ động là dựa vào một kỹ thuật để làm tối ưu chiến lược tiêm chủng HIV-1. Khi đưa gen *env* của HIV-1 vào các tế bào chuột theo cách tiêm DNA plasmid trần thì sẽ hình thành các ĐUMD tế bào và thể dịch đặc hiệu cao. Hơn nữa, sự biểu hiện của các plasmid mã cho glycoprotein vỏ HIV-1 hay các hạt HIV khiếm khuyết không gây thâm nhiễm rõ ràng có thể tạo được kháng thể tức thời đối với Env và sự biểu hiện hệ gen HIV khiếm khuyết sẽ làm tăng hoạt tính của tế bào T gây độc tế bào đối với protein Gagp24 của HIV. Mới đây, người ta đã thu được nhiều kết quả khi sử dụng vaccine kháng HIV cơ sở DNA trên tinh tinh. Mặc dầu khi tiêm DNA đã cho các ĐUMD, nhưng những động vật

được tiêm chủng vẫn còn phải gánh chịu những thách thức của HIV sau khi ngừng tiêm. Vấn đề này đòi hỏi phải có các nghiên cứu về tiềm năng hình thành các ĐUMD mạnh trực tiếp với HIV. Tuy nhiên, cũng cần phải chứng minh rằng liệu có tồn tại một ĐUMD kháng lại được các nòi HIV đa hình hay không?

14.6.2 Các lympho T gây độc tế bào đặc hiệu HIV

Sử dụng các tế bào của chính cá thể bị thâm nhiễm (các tế bào lympho CD4+ và CD8+, các tế bào gốc tạo máu CD34+ hoặc các kháng nguyên có mặt trên tế bào như đại thực bào chẳng hạn) để trả lại thụ động chức năng hệ miễn dịch là một kỹ thuật khác trong việc phát triển GTL đối với thâm nhiễm HIV. Miễn dịch trị liệu trực tiếp đi cùng với việc mở rộng *ex vivo* đối với các quần thể tế bào T chọn lọc, các tế bào lympho CD4+ hoặc CD8+ sau đó được truyền lại vào các cá thể bị thâm nhiễm HIV -1. Tiêu điểm chính của trị liệu tế bào với thâm nhiễm HIV-1 là các tế bào CD8. Mặc dù hệ thống hòa hợp tổ chức chính có vai trò quan trọng với việc hạn chế CD8 CTL trong thâm nhiễm HIV-1 vẫn chưa rõ, nhưng rõ ràng là khi mới chớm thâm nhiễm thì việc tăng các tế bào CD8 đặc hiệu HIV có liên quan tới các giải pháp của virus huyết. Những số liệu này đã chứng minh chắc chắn rằng lớp I hệ thống hòa hợp tổ chức chính đã làm giới hạn vai trò của các tế bào CD8 trong việc hạn chế thâm nhiễm trong pha cấp (các giai đoạn sớm) của sự thâm nhiễm. Người ta đã chứng minh rằng có sự phát triển lớp I hệ thống hòa hợp tổ chức chính nhằm hạn chế CD8 đặc hiệu đối với một số protein HIV bao gồm Env, Gag, Pol, Vif và Nef trong các cá thể thâm nhiễm HIV. Các tế bào T gây độc tế bào đặc hiệu HIV (Tc) được sản xuất do sự mở rộng *ex vivo* các bề tế bào T CD8+ với sự có mặt của các kháng nguyên HIV-1 (các peptide gag, env v.v..). Các dòng tế bào của CD8 đặc hiệu kháng nguyên sẽ được truyền lại cho chính cá thể thâm nhiễm HIV-1. Những số liệu ủng hộ cho việc sử dụng các dòng Tc cá thể đặc hiệu HIV để giới hạn sự thâm nhiễm HIV-1 dựa trên cơ sở quan sát thấy các tế bào CD8 có thể ức chế sự sao chép của HIV trong PBL người *in vitro*.

14.7 Các khía cạnh thực tiễn của gen trị liệu HIV

14.7.1 Các đích tế bào của GTL

Nơi có nhiều thâm nhiễm và sự sao chép HIV-1 là các tế bào lympho, các tế bào gốc tủy xương (đại thực bào, các tế bào đơn nhân). Để GTL HIV-1 đạt hiệu quả, vấn đề sống còn là các tế bào từ các dòng này được sử dụng như là đối tượng nhận trong GTL kháng HIV-1.

Các tế bào gốc tạo máu đa năng (haemtopoietic stem cells-HSC) sản sinh ra tất cả các tế bào lympho và các tế bào tủy xương. Vì vậy, các tế bào này là các ứng cử viên chót cho việc sử dụng trong GTL. Theo lý thuyết, sự bảo vệ vĩnh viễn khỏi sự thâm nhiễm HIV có thể thu được kết quả thông qua việc đưa các gen kháng HIV-1 vào trong các HSC, bởi vì các tế bào này tự sản sinh và vì thế sẽ tạo ra vô tận quần thể các tế bào kháng HIV. Tuy nhiên, cho tới nay vẫn chưa thể phân lập được các quần thể HSC thuần khiết, nhưng một vài kỹ thuật làm giàu trên cơ sở chọn lọc các tế bào CD34+ đã được phát triển. Các tế bào được làm giàu CD34+ có thể phân lập được từ tủy xương, từ các tế bào máu ngoại biên hoặc từ máu dây rốn. Nói chung các tế bào CD34+ phân lập từ mọi nguồn đều sử dụng tốt trong các phân tích *in vitro* cho GTL HIV-1. Điều đáng tiếc là mức độ chuyển gen

thu nhận được sau khi những tế bào này được truyền lại *in vivo* là rất thấp (1-5%). Người ta đã xác định được rằng sự biểu hiện khởi đầu gen được cài của các tế bào CD34+ có thể là “câm” trong một thời gian dài.

Sự biểu hiện gen câm này có thể là kết quả của sự methyl hóa các cấu trúc trị liệu gen. Vì thế, việc cải tiến kỹ thuật chuyển gen và tăng sự biểu hiện gen thì dần dần có thể tạo được các ứng cử viên HSC cải biến dùng được cho GTL.

Do việc chuyển gen vào các HSC là kém hiệu quả nên các nhà nghiên cứu đã chuyển hướng sang các tế bào chủ chốt nổi bật của HIV-1, các tế bào T CD4+ chín như là đích cuối cùng của GTL. Các tế bào lympho CD4+ hy vọng có thể xóa đi việc phân lập từ máu ngoại biên hay làm giàu bằng cách rút hết các tế bào CD8+. Khi sử dụng các tế bào CD4+ có thể thu được các mức tải nạp cao và các tế bào này có thể được lựa chọn trong khi mở rộng nuôi cấy mô để truyền lại cho bệnh nhân.

Những câu hỏi xung quanh việc sử dụng các tế bào lympho CD4+ cho GTL đều đề cập đến tiềm năng sinh trưởng và thời gian sống của tế bào. Những nghiên cứu sơ bộ trên các động vật cao cấp không phải người đã khám phá được một số ít tế bào T tải nạp có thể được hồi phục từ máu ngoại biên của khỉ rhesus 2 tuổi sau khi chỉ tiêm đơn các tế bào đánh dấu gen. Các nghiên cứu trên người khi sử dụng các tế bào lympho xâm nhập khối u đánh dấu gen (gene-marked tumor infiltrating lymphocyte-TIL) đã cho thấy các tế bào TIL sẽ tồn tại được vài tuần *in vivo*. Những nghiên cứu trên động vật cao cấp gần đây trong đó các tế bào lympho CD4+ bản thân được tải nạp với vec tơ retrovirus của HIV đã chỉ rõ rằng một số ít tế bào lympho tải nạp đã tồn tại được vài tháng ở máu ngoại biên và hạch lympho của những động vật này. Một quy trình (protocol) lâm sàng đánh dấu gen liên quan tới cấp sinh đôi đồng loại cho thấy các tế bào lympho được đánh dấu gen chỉ có một ít sống tới 14 tuần lễ trong các cá thể thâm nhiễm HIV-1. Những kết quả thử nghiệm GTL lâm sàng ADA-SCID chỉ rõ các lympho được truyền vào có thể sống và phân chia trong 4 năm sau đó. Các tế bào lympho tải nạp được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng ADA đã làm tăng tuổi thọ bởi vì người ta cho rằng các tế bào tải nạp có lợi thế hơn các tế bào lympho không được tải nạp do có mặt sản phẩm gen ADA. Hơn nữa, còn rất nhiều bằng chứng chứng tỏ rằng có sự tồn tại dài hạn các tế bào lympho chín ở một số thí nghiệm.

14.7.2 Các hệ thống chuyển gen

Để GTL có hiệu quả, điều cần thiết là phải được chuyển được gen vào trong các tế bào đích. Các hệ thống chuyển gen hiệu quả nhất đều dựa trên cơ sở vec tơ virus tái tổ hợp. Có nhiều hệ thống chuyển gen bao gồm các vec tơ cơ sở retrovirus, herpes virus, adenovirus và virus adeno liên hợp đã được phát triển. Một số kỹ thuật chuyển gen không virus hiện nay cũng đang được đánh giá về hiệu quả. Các hệ thống chuyển gen virus đã được làm test ở cả HSC cũng như PBL. Chỉ các vec tơ retrovirus thì mới chuyển giao hiệu quả các gen vào trong tế bào đích, mặc dầu với mức độ thấp ở HSC. Vì thế sự chuyển gen qua trung gian retrovirus hiện nay là hệ thống chuyển gen tối ưu nhất có thể sử dụng trong GTL HIV-1. Giới hạn của các vec tơ retrovirus là không có khả năng thâm nhiễm các tế bào không phân chia vì nó đòi hỏi phải có sao chép DNA thì mới hợp nhất được vào trong hệ gen tế bào chủ.

Các hệ thống chuyển gen trung gian không phải virus gồm các cộng hợp liposome, các ligand receptor, tiêm trực tiếp DNA trần và sự chuyển gen qua trung gian các hạt. Những

phương pháp chuyển gen này có hiệu quả trong những trường hợp biểu hiện tức thì các sản phẩm gen nghiên cứu. Nhìn chung, hầu hết các hệ thống này đều không có hiệu quả trên các tế bào tạo máu lympho. Đối với vấn đề này, các nhà nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật ném bom hạt (particle bombardment technology) để chuyển protein RevM10 không trội *trans* tới các tế bào lympho CD4+. Mức khởi đầu của chuyển gen là 0,1 đến 10%, mức này thấp hơn so với các vec tơ retrovirus. Sự biểu hiện gen do ném bom hạt cũng chỉ là nhất thời và mọi lợi ích trị liệu cũng chỉ là nhất thời. Tuy nhiên, thí nghiệm này cũng đã chứng minh được tiềm năng của việc sử dụng kỹ thuật chuyển gen qua trung gian các hạt trong GTL HIV-1, những vấn đề kỹ thuật nêu trên cần phải được giải quyết trước khi nó được chấp nhận như một hệ thống chuyển gen được sử dụng trong lâm sàng.

14.7.3 Các thử nghiệm lâm sàng GTL kháng HIV

Có 18 quy trình GTL HIV-1 khác nhau đã được xem xét và phê chuẩn bởi hội đồng tư vấn DNA tái tổ hợp (recombinant DNA Advisory committee –RAC) (11-1997). Các thử nghiệm lâm sàng có thể chia thành 3 chủng loại: (1) các nghiên cứu dấu chuẩn gen, (2) trị liệu miễn dịch, các chiến lược GTL này nhằm kích thích ĐUMD kháng HIV-1 và (3) ức chế sao chép của virus, các chiến lược kháng HIV-1 này nhằm ức chế sự sao chép của virus nội bào (Bảng 14.2). Tất cả các dự định thử nghiệm lâm sàng đều sử dụng các kỹ thuật như đã thảo luận ở trên như các protein không trội *trans*, ribozyme, các tế bào T độc tế bào đặc hiệu virus, antisense acid nucleic hoặc các kháng thể chuỗi đơn v.v.. Chúng ta hãy điểm qua một vài ví dụ cụ thể sau đây:

14.7.3.1. Đánh dấu các tế bào T đồng gen

Người ta đã bắt đầu nghiên cứu dấu chuẩn gen về các phương diện an toàn và sự tồn tại của các tế bào lympho đồng gen được đánh dấu gen trong một cặp HIV-1 tương đồng bất hòa (HIV-1 discordant identical twin - một cặp thâm nhiễm HIV và một cặp không bị nhiễm). Mục tiêu của dự án chế thử pha I/II là đánh giá sự phân phối, sự tồn tại, sự dung nạp, độ an toàn và tính hiệu quả của việc truyền các tế bào lympho T đồng gen có dấu chuẩn gen hoạt hóa thu nhận từ cặp tương đồng cho các đối tượng nhận cặp thâm nhiễm HIV. Quy trình này là những bước khởi đầu trong một trình tự các nghiên cứu thiết kế nhằm xác định giá trị tiềm tàng của các tế bào lympho T đã được công nghệ hóa (CD4+ và CD8+) để ngăn ngừa hoặc kiểm soát sự thâm nhiễm HIV. Nghiên cứu này sẽ cho ta những số liệu cơ bản ban đầu cần thiết cho việc xác định số phận của các tế bào CD4+ và CD8+ sau khi được truyền lại vào người bị thâm nhiễm HIV.

14.7.3.2. Đánh dấu các tế bào T độc tế bào

Nghiên cứu thứ hai về đánh dấu gen có liên quan tới miễn dịch trị liệu khi dùng các tế bào CD8+ đặc hiệu HIV đã cải biến di truyền cho bệnh nhân có huyết thanh HIV dương tính. Mục tiêu của thử nghiệm này là: khảo sát độ an toàn và độc tính với các liều lượng tăng dần của CD8+ tự thân đối với người nhiễm HIV. Chúng ta biết rằng, trước khi phát triển thành AIDS, những người có huyết thanh HIV dương tính thường có phức hợp hòa hợp tổ chức chính (MHC) lớp I kháng CD8+ CTL có mặt với tần suất cao ở máu ngoại biên. Nhân

tổ căn bản của việc sử dụng các dòng tế bào T đặc hiệu HIV là làm giới hạn sự thâm nhiễm HIV-1 trên cơ sở quan sát thấy rằng các tế bào CD8+ có thể ức chế được sự sao chép của HIV trong các tế bào lympho người *in vitro*. Hơn nữa, trị liệu miễn dịch với việc sử dụng các dòng đặc hiệu CMV nhân rộng cho thấy có hiệu lực đối với sự tái thiết lập các ĐUMD tế bào T đặc hiệu CMV. Vì thế trị liệu miễn dịch với CD8+ CTL nhân rộng *in vitro* có thể có hiệu ứng kháng virus tốt.

Bảng 14.2 Các thử nghiệm lâm sàng với HIV-1

Mô tả quy trình	Trạng thái	Nhà nghiên cứu	Viện nghiên cứu
Quy trình đánh dấu gen			
Độ an toàn của việc chuyển các tế bào lympho đồng loại đã cải biến gen trong cặp tương đồng thâm nhiễm HIV-1	mở	Walker	Viện sức khỏe quốc gia Hoa kỳ
Độ an toàn của việc chuyển các tế bào T độc tế bào đồng loại đã cải biến gen trong cặp tương đồng thâm nhiễm HIV-1 (pha I/II)	mở	Walker	Viện sức khỏe quốc gia Hoa kỳ
Tải nạp các tế bào CD34+ từ tủy xương của trẻ em thâm nhiễm HIV-1 : dấu chuẩn so sánh bằng bẫy RRE (pha I)	mở	Kohl	Bệnh viện Nhi Los Angeles
Tải nạp các tế bào con cháu máu ngoại biên đồng loại CD34+ từ những người thâm nhiễm HIV-1 : nghiên cứu so sánh dấu chuẩn với việc sử dụng một gen ribozyme và một gen trung hòa (pha I)	mở	Kohl	Bệnh viện Nhi Los Angeles
Quy trình trị liệu miễn dịch			
Độ an toàn của miễn dịch trị liệu khi sử dụng các tế bào T đặc hiệu CD8+ HIV đã cải biến gen	mở	Greeberg	Trung tâm ung thư Fred Hutchinson
Độ an toàn và hiệu ứng sinh học	đóng	Viagene, Inc.	

của các vec tơ retrovirus chuột mã
cho HIV-IT (V) ở những cá thể không
có triệu chứng (pha I)

Độ an toàn và hiệu ứng sinh học
của các vec tơ retrovirus chuột mã
cho HIV-IT (V) trong cá thể không
có triệu chứng (pha I)

đóng

Viagene, Inc.

Độ an toàn và hoạt tính sinh học
của HIV-IT (V) trong các cá thể
thâm nhiễm HIV-1 (pha I/II)
Độ an toàn liều lặp lại và hiệu ứng
trong những cá thể thâm nhiễm HIV-1
với > 100 tế bào CD4+ (pha II)

đóng

Trường Đại Học
California, San Diego

Multiinstitute

Phương pháp mù kép đánh giá độ
an toàn và liều cảm ứng CTL tối ưu
của HIV-IT (V) trong các đối tượng
nhiễm HIV (pha I/II)

đóng

Merritt

VIRx, Inc. Viagene
Inc.

Độ an toàn của miễn dịch trị liệu TB
sử dụng các tế bào T đặc hiệu
CD8+ HIV cải biến và không cải biến
gen đồng loại trong những cá thể có
huyết thanh dương tính (pha I)

mở

Ridell

Trung tâm ung thư
Fred Hutchínson

Quy trình ức chế sao chép

Hiệu ứng của Rev (pha I)
không *trans* trội

mở

Nabel

Trường Đại Học
Michigan

Độ an toàn và hiệu ứng của
ribozyme phân giải HIV-1 ở
những người thâm nhiễm
HIV-1 RNA (pha I)

mở

Wong-Staal

Trường Đại Học
California, San Diego

Chuyển gen qua trung gian
retrovirus của HIV-1 antisense TAR
và gen protein Rev tới các tế bào
lympho đồng loại trong cặp tương
đồng thâm nhiễm HIV-1 (pha I)

mở

Morgan

Viện sức khỏe
quốc gia Hoa kỳ

Các kháng thể nội bào kháng
protein vỏ HIV-1 đối với AIDS
(pha I)

mở

Marasco

Viện ung thư
Dana Farber

Các tế bào tạo máu con cháu
CD3+ đồng loại tải nạp với một
ribozyme kháng HIV-1 (pha I)

mở

Rosenblatt

Trường Đại Học
California, Los angeles

Nghiên cứu đối chứng ngẫu

mở

Connick

Multiinstitute

nhiên hoạt tính và độ an toàn của các tế bào T đã cải biến gen CD4-Zeta trong những bệnh nhân thâm nhiễm HIV (pha II)

Độ an toàn sự tồn tại <i>in vivo</i> của các tế bào T CD4+ đồng loại đã cải biến gen được chuyển tới để kháng lại sự sao chép của HIV (pha I)	mở	Gilbert	Trung tâm ung thư Fred Hutchinson
Tiêm chủng nội bào kháng lại sự thâm nhiễm HIV-1 nhờ sử dụng đoạn chuỗi đơn biến đổi kháng Rev (pha I)	mở	Pomerantz	Trường Đại Học Thomas Jefferson

14.7.3.3 Rev trans trội

Với sự khích lệ của các dẫn liệu tiền lâm sàng thu được với các đột biến *trans* trội của RevM10, một quy trình lâm sàng đã được dự kiến bằng việc các tế bào lympho T CD4+ lấy từ một bệnh nhân thâm nhiễm HIV-1 sẽ được công nghệ hóa với vec tơ biểu hiện Rev M10. Trong nghiên cứu này, sẽ đánh giá hiệu ứng của sự ức chế nội bào với thâm nhiễm HIV bởi protein Rev thể đột biến *trans* trội của M10. Mục đích của dự kiến này là xác định xem liệu sự biểu hiện của M10 có làm kéo dài sự sống sót của PBL trong các bệnh nhân AIDS hay không, có như vậy thì mới bàn tới khả năng bảo vệ kháng lại sự thâm nhiễm HIV-1. Các tế bào lympho T CD4+ của các bệnh nhân sẽ được cải biến nhờ sự chuyển gen qua trung gian các hạt hoặc qua trung gian retrovirus. Trong mỗi trường hợp, vec tơ kiểm chứng đều tương đồng với RevM10, nhưng có sự xê dịch khung làm bất hoạt sự biểu hiện gen sẽ được sử dụng để tải nạp đồng thời một quần thể tế bào CD4+. Sự tải nạp của retrovirus và sự thâm nhiễm qua trung gian các hạt sẽ được thể hiện sau khi các tế bào giàu CD4+ được kích thích với IL-2 và các kháng thể kháng CD3 hoặc kháng CD28. Sự hoạt hóa của HIV-1 nội sinh sẽ bị ức chế khi cho thêm chất ức chế phiên mã ngược cộng với một gen gây độc đặc hiệu HIV (CD4-PE40). Những tế bào đã công nghệ hóa rồi được nhân rộng sẽ đưa trở lại cho bệnh nhân và sự sống sót của các tế bào trong mỗi nhóm được so sánh bằng PCR pha loãng giới hạn. Hiệu ứng của RevM10 trên HIV-1 và các thông số miễn dịch học cũng được đánh giá một cách chi tiết.

14.7.3.4 Rev trans trội trong sự tổ hợp với antisense TAR

Để ức chế đặc hiệu chức năng của Rev, người ta đã tạo ra một thể đột biến mới của Rev *trans* trội (RevTD) do đột biến Rev M10 như đã mô tả ở trên. Điều đó cho thấy, chỉ với sự có mặt của một đột biến điểm ở domain hoạt hóa cũng đủ dẫn tới một kiểu hình không trội. Để ức chế chức năng Tat, một chiến lược antisense đã được phát triển nhằm đích vào yếu tố đáp ứng hoạt chuyển HIV-1 (TAR). Người ta thiết lập một vec tơ retrovirus biểu hiện tRNA_i – Met chimeric của antisense TAR (promoter pol III – antisense TAR) hòa với bản phiên mã bổ cứu vùng HIV-1 TAR. Nhờ sử dụng các thử nghiệm thâm chuyển ổn định và nhất thời đã cho thấy antisense TAR ức chế sự hoạt chuyển qua trung

gian Tat của LTR ở HIV-1. Cơ chế chính xác liên quan tới sự ức chế này chưa rõ hoàn toàn, nhưng nó có thể liên quan tới sự ức chế liên kết Tat trên yếu tố TAR hoặc sự phân giải cặp RNA bởi RNase giữa antisense TAR và các trình tự đích bảo cứu của nó. Cặp RNA này có thể ức chế sự liên kết của ribosome và tổng hợp protein.

Một quy trình lâm sàng bổ sung cho GTL bệnh AIDS là ứng dụng sự chuyển gen qua trung gian retrovirus để chuyển antisense TAR và gen RevTD tới các tế bào lympho đồng loại trong cặp tương đồng bất hòa thâm nhiễm HIV-1. Nghiên cứu pha I này dựa trên các số liệu tiền lâm sàng với antisense TAR và các vec tơ retyrovirus RevTD trong việc chuyển các tế bào T CD4+ đồng loại đánh dấu neomycine trên cặp tương đồng bất hòa HIV-1 như đã mô tả ở trên. Trong thử nghiệm lâm sàng người ta sẽ đánh giá độ an toàn, sự sống sót và hiệu ứng tiềm tàng của sự vận chuyển các tế bào lympho đồng loại được công nghệ hóa thu nhận từ các cặp tương đồng có huyết thanh âm tính với HIV ở đối tượng nhận.

14.7.3.5 Các ribozyme kháng HIV

Một quy trình GTL với AIDS dự định sẽ sử dụng ribozyme hairpin đặc hiệu đoạn dẫn của HIV-1. Trong thử nghiệm lâm sàng pha I này, độ an toàn và hiệu quả của GTL ribozyme sẽ được đánh giá ở những bệnh nhân nhiễm HIV-1 bằng cách truyền lại cho các tế bào T CD4+ bản thân đã tải nạp *ex vivo* một vec tơ retrovirus biểu hiện ribozyme trình tự dẫn của HIV-1.

Sự tải nạp của các tế bào thâm nhiễm HIV-1 *in vitro* đòi hỏi các điều kiện nuôi cấy sao cho có thể ức chế được sự lan rộng của HIV-1 nội sinh, điều này có thể thực hiện được bằng cách cho thêm các tác nhân kháng HIV như nevirapine và CD4-PE40. Động học và sự sống sót *in vivo* của các tế bào tải nạp ribozyme sẽ được so sánh đối chứng bằng PCR pha loãng giới hạn. Mức biểu hiện và sự kéo dài biểu hiện ribozyme cũng sẽ được khảo sát đánh giá. Kết quả này sẽ xác định được liệu ribozyme này có bảo vệ các tế bào T CD4+ ở các bệnh nhân nhiễm HIV-1 hay không và sẽ giúp cho việc thiết kế các thử nghiệm GTL tế bào gốc tạo máu đối với AIDS trong tương lai.

14.7.3.6 Vaccine gen

Có hai quy trình lâm sàng đã được phê chuẩn của RAC/FDA để test độ an toàn và hiệu ứng tiềm ẩn của việc tiêm chủng gen trong các cá thể nhiễm HIV-1. Trong quy trình 1, nguyên bào sợi của các bệnh nhân nhiễm HIV sẽ được rút ra để tải nạp *ex vivo* với một vec tơ retrovirus cơ sở MoMLV có khả năng trị liệu miễn dịch tiềm năng, mã cho các protein Env/Rev của HIV-1 (được thiết kế là HIV-IT). Còn quy trình thứ hai, HIV-IT sẽ được tiêm vào cơ những bệnh nhân nhiễm HIV-1 để có sự thâm nhiễm *in situ*. Quy trình lâm sàng pha I của sự tiêm chủng gen *ex vivo* liên quan tới 3 liều hiệu quả (và một bộ củng cố 3 liều hiệu quả) nguyên bào sợi bản thân tải nạp HIV-IT. Những nguyên bào sợi này được thu nhận từ sinh thiết da và sau đó tải nạp với vec tơ HIV-1, rồi được chọn lọc, chiếu xạ, làm test đối chứng chất lượng rồi đưa trở lại vào người. Quy trình tiêm trực tiếp *in vivo* là một thử nghiệm lâm sàng đối chứng placebo pha I liên quan tới việc phân phối vec tơ HIV-IT hoặc đối chứng pha loãng với những người không có triệu chứng nhưng huyết thanh lại dương tính với thâm nhiễm HIV-1 mà hiện chưa được xử lý kháng retrovirus. Việc xử lý vec tơ trực tiếp bao gồm hàng loạt mũi tiêm vào cơ, mỗi tháng 3 lần. Những

người được xử lý sẽ có những khảo sát về độc tính cấp và các thông số lâm sàng bình thường, mức CD4, đáp ứng của tế bào T đặc hiệu HIV và virus tải nạp trước, trong và sau khi xử lý. Các số liệu lâm sàng sơ bộ đã chứng minh được rằng những bệnh nhân thâm nhiễm HIV được xử lý với nguyên bào sợi bản thân tải nạp vec tơ đã làm tăng đáp ứng của HIV-1 III B Env đặc hiệu cho đáp ứng CD8+CTL. Người ta hy vọng rằng việc gây miễn dịch qua trung gian vec tơ retrovirus sẽ làm cân bằng sự tấn công miễn dịch *in vivo* bởi các CTL đặc hiệu và các đáp ứng kháng thể có thể loại trừ được các tế bào thâm nhiễm HIV và dọn sạch virus tự do khỏi các cá thể thâm nhiễm HIV-1.

14.7.3.7 Các kháng thể nội bào

Các kháng thể nội bào có thể được thiết lập với đích là các protein của HIV. Quy trình dự kiến là dùng kháng thể nội bào kháng vỏ (gp120) sFv105 để thử nghiệm GTL kháng HIV. Việc lựa chọn vỏ HIV như đích tấn công vì sự nguy hại tiềm ẩn của gp160 trong sự hình thành hợp bào, sự làm chết các tế bào đơn và gây bệnh tiềm tàng cho các tế bào độc lập với virus. Kế hoạch nghiên cứu này thu nạp 6 bệnh nhân đã trải qua sự lymphopheresis từ PBMC giàu CD4+. Trong một quy trình khác, các tế bào thâm nhiễm HIV khi được dùng thuốc kháng HIV nevarapine và CD4-PE40 thì thấy đã bộ hiệu ứng GTL đối với virus HIV và mức tế bào lympho CD4+ hiện hữu.ức chế được sự lan rộng HIV *in vitro*.

Các tương đồng tế bào lympho sẽ được tải nạp với vec tơ retrovirus biểu hiện sFv105 hoặc với vec tơ chứa gen *Neo* đối chứng (LN). Sau khi tải nạp, các tế bào đã cộng nghệ hóa sẽ được làm giàu bằng chọn lọc gen *Neo* tức là cho phát triển ở môi trường chứa G418. Một lượng lớn các tế bào được tải nạp và nuôi cấy mở rộng sẽ được đưa trở lại cho bệnh nhân. Các bệnh nhân sau đó sẽ được theo dõi bởi PCR giới hạn để định lượng số tế bào tải nạp đang lưu thông nhằm đánh giá sự biểu hiện của gen chuyển sFv105 *in vivo* trong các tế bào lympho tải nạp.

14.8 Kết luận

Đã có nhiều chiến lược GTL ức chế hiệu quả HIV-1 *in vitro*. Những tiến bộ đáng kể vừa đạt được gần đây đã chứng minh rằng các tế bào lympho T CD4+ sơ cấp có thể bảo vệ tránh khỏi sự thâm nhiễm HIV-1, vấn đề này bao gồm việc phân lập những bệnh nhân sơ cấp sau đó được xử lý bằng GTL trên cơ sở các protein HIV đột biến *trans* trội, antisense và ribozyme. Những số liệu gần đây thu được do gây miễn dịch qua trung gian vec tơ cũng rất khích lệ vì sự tồn tại dài hạn của các CTL và sự bảo vệ chéo kháng lại các nòi HIV-1 đa hình dị loại đã được chứng minh ở các mô hình động vật. Cơ sở cho những phát hiện tiền lâm sàng này là sự phê chuẩn của RAC/FAD đối với một số chiến lược nhằm test các đối tượng thâm nhiễm HIV-1. Người ta hy vọng rằng các thử nghiệm lâm sàng này sẽ tạo điều kiện cho việc xem xét khả năng đề kháng của các tế bào đối với sự thâm nhiễm HIV-1 bằng GTL, mở ra một tương lai đẹp đẽ cho GTL.

Chương XV

ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH UNG THƯ

15.1 Mở đầu

Ung thư xảy ra do mất các yếu tố điều hòa kiểm soát sự sinh trưởng và tăng sinh của tế bào. Mất sự kiểm soát điều hòa có thể do các đột biến ở gen mã cho quá trình điều hòa. Nói chung, các đột biến thoái hóa gen đều liên quan tới làm mất các chức năng, như trường hợp gen ức chế khối u chẳng hạn. Có đột biến trội lại liên quan tới việc tạo thêm chức năng như sự biểu hiện quá mức bình thường một gen ung thư lại chẳng hạn. Các dạng đột biến cũng có thể làm mất sự điều hòa phát triển tế bào. Thao tác các đột biến gen và tăng cường các yếu tố tế bào là mục tiêu của GTL đối với ung thư. Như vậy GTL điều trị ung thư nhằm: (1) thay thế các gen kiểm chế ung thư đã bị đột biến, (2) làm bất hoạt các gen ung thư biểu hiện quá mức, (3) chuyển các thành phần của các tiền thuốc (prodrug) đích và (4) cải biến sửa đổi các đáp ứng miễn dịch kháng khối u.

Tế bào biểu mô bình thường U tuyến nhỏ U tuyến vừa U tuyến lớn Caxinom

○⇒ ○⇒ ○⇒ ○⇒ ○⇒ ○⇒ ○

Alen hệ gen đặc hiệu giai đoạn

APC/APC
MSH2/MSH2
RAS/RAS
DCC/DCC
p53/p53

APC/APC
MSH2/MSH2
RAS/RAS
DCC/DCC
p53/p53

APC/APC
MSH2/MSH2
RAS/RAS
DCC/DCC
p53/p53

APC/APC
MSH2/MSH2
RAS/RAS
DCC/DCC
p53/p53

APC/APC
MSH2/MSH2
RAS/RAS
DCC/DCC
p53/p53

Hình 15.1 Cơ sở di truyền của sự tạo khối u. Sơ đồ đại diện đột biến trình tự của sự phát triển ung thư biểu mô từ các tế bào biểu mô bình thường. Những chữ viết tắt là: APC (adenomatous poliposis coli gene) (gen coli gây polyp); MSH2 - gen 2 sửa chữa DNA của động vật có vú; Ras - gen ung thư; DDC- những loại bỏ trong gen gây ung thư; p53- gen kiểm chế khối u. Những đột biến trong gen sửa chữa DNA sẽ được khởi đầu ở các tế bào bình thường (nét đậm) với các đột biến kế tiếp trong APC (chữ nghiêng) xảy ra như một sự kiện sớm trong sự phát triển một khối u nhỏ. Đột biến ở gen ung thư RAS (hoạt hóa bởi đột biến điểm) làm phát triển các khối u trung bình với sự loại bỏ tiếp theo của gen DDC trong giai đoạn khối u đã phát triển lớn. Đột biến chốt ở gen kiểm chế khối u p53 sẽ hình thành nên các khối u.

(Theo Simon J. Hall, Thomas F. Kresina, Richard Trauger và Barbara A. Conley. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

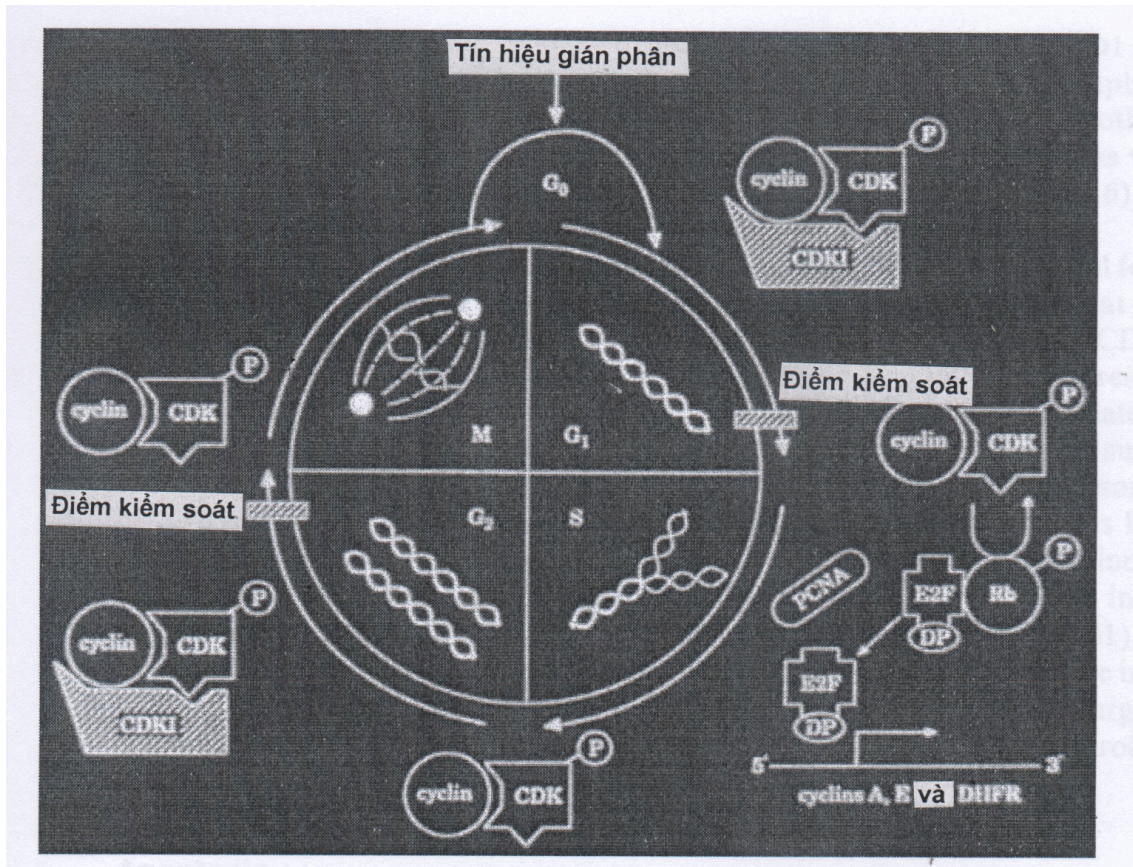
15.2 Cơ sở di truyền của gây ung thư

Những biến đổi trong các quá trình bình thường của tế bào như sự tăng sinh, sự biệt hóa và sự chết theo chương trình – apoptosis đều góp phần vào việc phát triển ung thư. Sự biến đổi các sản phẩm của gen này cũng sẽ dẫn tới các khối u lành tính, tiền ác tính hoặc ác tính. Chúng bao gồm các gen gây ung thư hoặc hoạt hóa các gen thúc đẩy sự tăng trưởng và các gen kiểm chế khối u hoặc làm bất hoạt các gen kiểm chế sinh trưởng. Hai đặc điểm quan trọng của việc sinh khối u đều liên quan tới sự biến đổi gen, đó là: (1) sự sinh khối u gồm nhiều bước và (2) sự mở rộng dòng. Sự hình thành khối u trải qua nhiều bước vì nó liên quan tới một số biến đổi gen hoặc những đưng chạm “hit” xảy ra một cách tuần tự ở các tế bào bình thường qua nhiều giai đoạn rồi dẫn tới ác tính như trình bày ở hình (15.1). Sự mở rộng dòng đối với một tế bào được xác định là do biến đổi gen (đột biến) xảy ra trong nhiều bước tạo khối u.

15.2.1 Chu kỳ tế bào

Chu kỳ tế bào gồm 5 pha dựa trên cơ sở hoạt động của tế bào (H.15.2). Thời kỳ sao chép DNA xảy ra ở pha (giai đoạn) S và phân bào có tơ ở pha M. Hai pha xen giữa là G1 và G2. Các tế bào giao phó chu kỳ sao chép cho pha G1 tại điểm giới hạn R. Thêm vào đó, từ pha G1 các tế bào có thể chuyển vào pha yên lặng G₀. Sự điều hòa chu kỳ tế bào gây cản nhất là ở các khớp chuyển pha G1/S và G2/M. Các cyclin điều hòa sự tiến triển chu kỳ tế bào ở khớp với kinase phụ thuộc cyclin (cyclin-dependent kinase – CDK). Cyclin tác động như một chất điều hòa cấu trúc bằng sự định vị dưới tế bào, đặc hiệu cơ chất, tương tác với các enzyme điều hòa lên và thời gian hoạt hóa của CDK. Vì vậy, mỗi một gen trong số 8 gen cyclin phân biệt (Bảng 15.1) sẽ điều hòa chu kỳ tế bào ở những điểm nhất định bằng cách gắn vào các CDK và hình thành phức hợp CDK/cyclin. Các cyclin được tổng hợp sẽ gắn và hoạt hóa CDK, sau đó được phân hủy. Các CDK sẽ phosphoryl hóa các cơ chất dưới tế bào như các protein u nguyên bào võng mạc (retinoblastoma) (pRb), nó ép buộc sự chuyển pha G1/S trong chu kỳ tế bào, vì thế pRb là một sản phẩm gen kiểm chế khối u. Sự phosphoryl hóa pRb xảy ra do sự tác động kế tiếp của phức hợp cyclinD-CDK4/6 và phức hợp cyclinE/CDK2 sẽ làm bất hoạt chức năng ức chế tăng trưởng của phân tử cho phép tiến triển chu kỳ tế bào. Vì thế sự tổng hợp các cyclin đặc hiệu và việc phức hợp với các CDK sẽ làm mất kiểm soát tăng trưởng tế bào. Chẳng hạn như cyclin D1 sẽ khởi đầu các đặc tính gen ung thư *in vitro* và *in vivo* và nó được khuếch đại rồi biểu

hiện quá mức trong các ung thư tế bào thực quản có vảy (esophagus squamous) cũng như ung thư đầu, cổ, bàng quang và vú. Cyclin còn có nhiều chức năng khác nữa, gen cyclin A cũng là vị trí hợp nhất virus viêm gan vào trong hệ gen. Vì thế ức chế sự phosphoryl hóa CDK là một mục tiêu quan trọng để giảm bớt sự tăng sinh của tế bào. Nhiều công trình nghiên cứu đã khẳng định rằng còn có các phân tử khác nữa cũng gắn và ức chế CDK. Protein hợp nhất CDK (Cip 1) gắn với phức hợp cyclin/CDK và ức chế sự hoạt động của chúng. Cip 1 được hoạt hóa bởi sản phẩm gen kiểm chế khối u p53 và bởi sự già yếu của tế bào. Vì thế Cip 1 là một ứng cử viên làm nhiệm vụ điều hòa sự tăng sinh và phân chia tế bào. Một chất ức chế khác là p16 hoặc chất kiểm chế đa khối u (MTS-1) ức chế đặc hiệu CDK4, nó có một locus gen ở nhiễm sắc thể 9p21. Trong các khối u ở tụy và thực quản, người ta quan sát thấy có sự loại bỏ hoặc có đột biến ở locus này. Chất ức chế CDK tự nhiên là p27 hoặc Kip 1, liên kết chặt chẽ với các phức hợp cyclinE/CDK2 hoặc cyclin D/CDK4. Kip 1 cũng có liên quan trong việc điều hòa trung gian các tín hiệu ngoại bào do sự biến đổi yếu tố tăng trưởng β 1 (TGF- β 1), do vậy mà suy ra được cơ chế ức chế tăng trưởng của TGF- β . Vì các chất ức chế sự phosphoryl hóa CDK làm tức đẩy sự hoạt động chu kỳ tế bào nên chúng đại diện cho các phân tử đích của GTL chống ung thư vì các phân tử này có thể ngăn chặn được hoạt tính tăng sinh của tế bào.



Hình 15.2 Chu kỳ tế bào. Năm pha của chu kỳ tế bào, những điểm kiểm soát quan trọng đối với sự điều hòa và tương tác của cyclin với kinase phụ thuộc cyclin (CDK). CDKI (chất ức chế) các gen

kiểm chế khối u như *Rb* (retinoblastoma – u nguyên bào võng mạc) và *DHFR* dihydrofolate reductase.

(Theo Simon J. Hall, Thomas F. Kresina, Richard Trauger và Barbara A. Conley. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Bảng 15.1 Cyclin và chu kỳ tế bào

Cyclin	Các pha của chu kỳ tế bào	Tác động điều hòa
C, D1, E	G ₁ /S	Xác định khi xảy ra chu kỳ mới
A	S, G ₂ M	Thúc đẩy sự gián phân
B1, B2	S, G ₂ M	Thúc đẩy sự gián phân

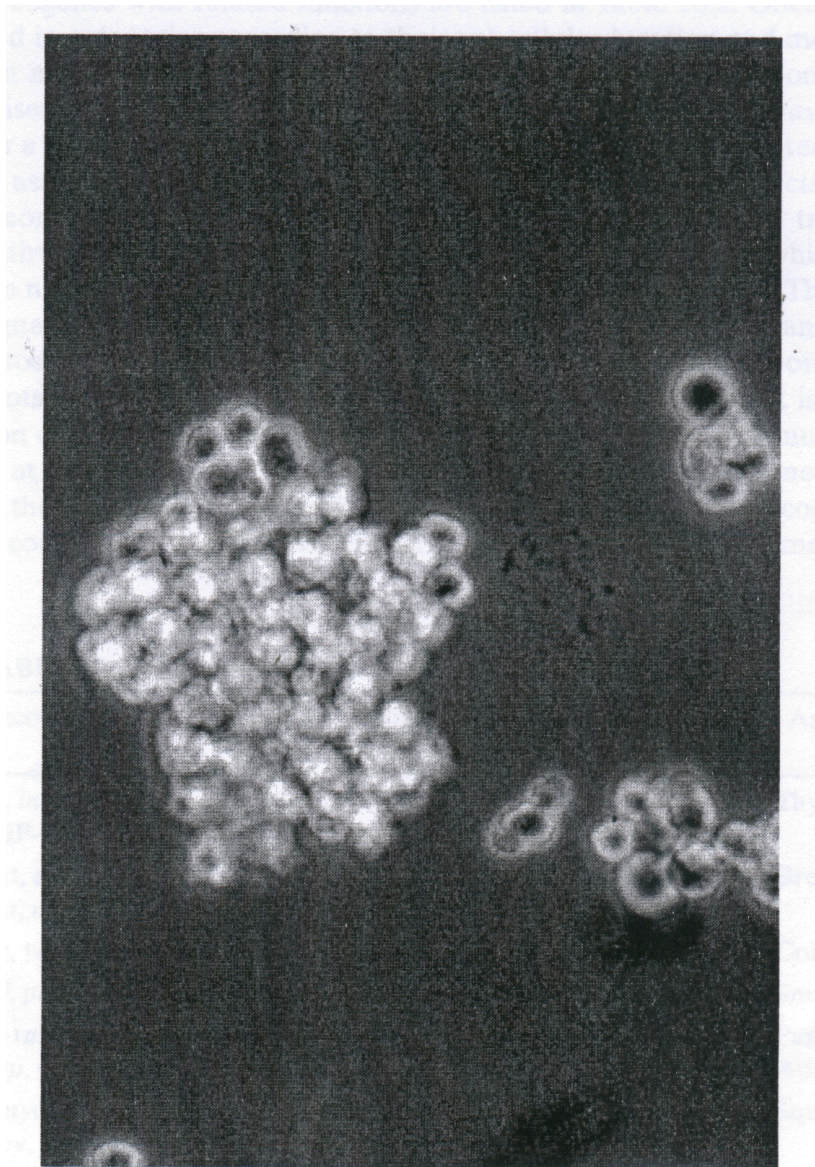
15.2.2 Sự chết theo chương trình của tế bào- apoptosis

Apoptosis – sự chết theo chương trình của tế bào có liên quan tới các sự kiện đặc biệt của nhân. Quá trình này bao gồm việc nén và tách riêng các chất nhiễm sắc thành những khối rõ nét kháng lại màng nhân, sự ngưng tụ tế bào chất, sự phân đoạn nhân hay cuộn lại trên bề mặt tế bào và sự hình thành các các thể apoptotic gắn màng. Những thực thể này sẽ được thực bào bởi các tế bào liên kề. Trong sự chết của tế bào có sự phân cắt DNA chuỗi kép ở các vùng kết nối giữa các nucleosome để tạo nên các đoạn khoảng 185 bp. Những đoạn này tạo nên những bậc thang trên điện di đồ. Cơ sở gen đối với sự chết theo chương trình của tế bào đã được sáng tỏ. Gen gây ung thư *bcl-2* lại bảo vệ các tế bào lympho và các neuron khỏi sự chết theo chương trình. Tuy nhiên, một protein khác có tên là *bax* tạo nên một dimer với *bel-2* và *bax* góp phần tạo nên sự chết theo chương trình của tế bào. Tỷ lệ tế bào của *bel-2/bax* sẽ xác định tế bào bị chết hay còn sống sót. Một protein bổ sung là enzyme chuyển đổi interleukin 1 β , ICE thúc đẩy mạnh sự chết của tế bào. Mới đây, *bax* – một thành viên tiền apoptotic của họ gen *bel-2* cũng đã được mô tả. Việc sử dụng *bax*, *bak*, *bel-2*, ICE hoặc các gen khác liên quan tới apoptosis trong kỹ thuật chuyển gen đích là một tiếp cận nhằm cải thiện khả năng sống của các quần thể tế bào đặc hiệu. Các tế bào ung thư có thể là đích gây chết nếu được cài vào các gen apoptosis. Mặt khác, các tế bào miễn dịch cũng tấn công vào các tế bào ác tính và như vậy nếu kết hợp cùng với việc chuyển gen apoptosis sẽ làm tăng khả năng đề kháng của cơ thể.

15.2.3 Sự biến nạp tế bào

các tế bào được nói là “được biến nạp” tức là chuyển từ kiểu hình bình thường sang kiểu hình ác tính. Các tế bào ác tính phơi bày các đặc tính tế bào phân biệt rõ rệt với các tế bào bình thường. Chẳng hạn như, trên cơ sở hình thái học thì các tế bào biểu mô là phân cực, không phân chia, hình dạng đồng nhất và đã được biệt hóa. Khi các tế bào biểu mô biến nạp thành ác tính thì nó trở nên không phân cực, đa hình, biểu hiện sự biệt hóa ở các mức độ khác nhau, mang hình ảnh gián phân, phân chia nhanh và biểu hiện kháng nguyên liên quan khối u trên bề mặt tế bào. Kháng nguyên liên quan khối u là đích của các tế bào khối u; thông qua các kháng thể đơn dòng, các liposome và các chất giống thuốc hoặc

độc tố sẽ gây cảm ứng làm chết những tế bào này. Cách tiếp cận đích này được sử dụng trong các quy trình GTL. Các tế bào cũng có thể được biến nạp bằng cách xử lý hóa học, bằng chiếu xạ, tự đột biến của các gen nội sinh hoặc sự thâm nhiễm virus. Các tế bào biến nạp được tạo ra theo cơ chế này có hình trụ, tránh được sự ức chế tiếp xúc phụ thuộc mật độ (kết thành cụm) do sự thả neo độc lập và không ức chế tăng trưởng bằng sự điều hòa giới hạn điểm của chu kỳ tế bào (H.15.3). Ngoài việc tế bào biến nạp sẽ trở thành tác nhân gây khối u khi chuyển vào các động vật non thì sự biến nạp do virus còn liên quan rất nhiều với GTL khi sử dụng các vec tơ virus. Mặc dầu các vec tơ virus khiếm khuyết sao chép đã được sử dụng trong chuyển gen, nhưng cũng có khả năng có sự tái tổ hợp của virus vec tơ với virus gây bệnh một cách tự nhiên, để tạo nên một virus biến nạp sao chép tốt.



Hình 15.3 Hình thái học các tế bào biến nạp virus Epstein – Bar. Lưu ý sự phát triển của những đám tụ thành hình tròn và các khuẩn lạc vệ tinh.

(Theo Simon J. Hall, Thomas F. Kresina, Richard Trauger và Barbara A. Conley. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

15.2.4 Các gen gây ung thư

Các gen gây ung thư của tế bào (gen ung thư tế bào) là các gen bình thường có liên quan tới sự sinh trưởng, tăng sinh, biệt hóa và hoạt hóa phiên mã. Các gen gây ung thư của tế bào có thể biểu hiện một cách lâm lạc bởi sự đột biến gen hoặc do sự sắp xếp lại /sự chuyển vị, khuếch đại biểu hiện gen hoặc thông qua việc mất các yếu tố điều hòa kiểm soát sự biểu hiện. Với các khiếm khuyết đó thì chúng được gọi là gen gây ung thư. Sự biểu hiện lâm lạc sẽ phát triển sự tăng sinh tế bào và gây ác tính. Tới nay đã có 60 gen gây ung thư đã được xác định có liên quan với nhiều loại khối u. Những gen ung thư chủ chốt cùng các chức năng liên quan được liệt kê ở bảng (15+.2). Các gen ung thư có thể phân thành các thứ hạng theo sự định vị ở mức dưới tế bào cũng như theo cơ chế tác động của chúng. Một ví dụ về gen ung thư là *ras*, bình thường vẫn ở trạng thái yên lặng, cấu trúc gồm một họ gen với 3 thành viên: *Ki-ras*, *Ha-ras* và *N-ras*. Mỗi gen mã cho một polypeptide 21-kD, protein p21 là một enzyme GTPase liên kết màng. Trong liên kết với màng sinh chất, p21 tương tác trực tiếp với enzyme *ras* serine-threonine kinase. Sự phức hợp này (*ras/raf*) được bắt đầu ở tầng (thác) tải nạp tín hiệu. Dọc theo con đường này là sự hoạt hóa MAP kinase, nó chuyển vị các yếu tố nhân và các yếu tố phiên mã nhân phosphoryl hóa. Con đường này cung cấp các tín hiệu cho tiến trình của chu kỳ tế bào, sự biệt hóa, sự vận chuyển protein, sự tiết và sự tổ chức khung tế bào. *Ras* dễ bị ảnh hưởng một cách đặc biệt với các đột biến điểm tại các “điểm nóng” (hot spots) dọc theo gen (mã 12,13,59 và 61). Kết quả là hoạt hóa cấu thành của gen và sản xuất quá mức protein p21. 80% ung thư tụy có liên quan tới các đột biến *ras*, điều đó cho thấy biến đổi gen này là một bộ phận trong nhiều giai đoạn tạo khối u của các tế bào tụy. Gen ung thư thứ hai là *c-myc*, gen này mã cho một protein có liên quan trong sự tổng hợp DNA; *c-myc* trong các tế bào bình thường đặc trưng cho sự tăng sinh, sự biệt hóa, sự chết theo chương trình của tế bào thông qua sự tác động của nó với tư cách như là một yếu tố phiên mã và protein gắn DNA. Sự biểu hiện *c-myc* tế bào có liên quan với sự tăng sinh tế bào và có quan hệ ngược lại với sự biệt hóa tế bào. Cần lưu ý rằng, sự biểu hiện cấu thành của *c-myc* sẽ làm cho tế bào mất khả năng thoát ra khỏi chu kỳ tế bào. Trong một số ung thư như ung thư kết tràng lại không có đột biến gen trong *c-myc*, nhưng mức mRNA lại tăng cao. Như vậy, mất điều hòa sau phiên mã cũng đáp ứng phần nào sự tăng sinh tế bào. Trong tất cả các trường hợp, những bất thường của gen ung thư đều là đích đặc hiệu của GTL.

Bảng 15.2 Các thứ hạng và chức năng của các gen ung thư chủ yếu

Gen gây ung thư	Chức năng	Các khối u liên quan
<i>sis</i> , <i>int-2</i> , K53, FGF-5 <i>int-1</i> , Met	liên quan yếu tố tăng trưởng	u giáp trạng

Ret, <i>erb-B 1-2, neu, fms met, trk, kit, sea</i>	tyrosine kinase của protein receptor	ung thư vú
<i>src, yes, fgr fgs/fes, abl</i>	tyrosine kinase của protein không phải receptor	ung thư kết tràng
<i>rà, pin0-1, mos, cot</i>	protein tế bào chất- serine kinase	ung thư phổi tế bào nhỏ
Ki-ras, Ha-ras, N-ras, <i>Gsp, gip, rho A-C c-myc, N - myc, L- myc mby, fos, jun, maf, cis, rel, ski, erb-A</i>	kinase protein G màng nhân tế bào	ung thư tuyến tụy u tế bào vảy

Các gen ung thư cũng có thể thấy ở các virus RNA gây khối u (retrovirus). Một số retrovirus có các gen biến nạp gọi là *v-onc* là các gen gây ung thư của virus. Ngoài ra còn có các gen mã hóa đặc biệt chẳng hạn như *gag, pol, và env*. Các gen gây ung thư virus xuất phát từ các đột biến điểm, sự loại bớt, sự cài lắp thêm và sự thay thế. Các gen ung thư tế bào có lẽ bắt gặp retrovirus trong một quá trình có tên là tải nạp retrovirus. Điều này xảy ra khi một retrovirus được cài vào hệ gen gần với gen ung thư tế bào. Người ta đã tạo được một gen virus lai mới và sau khi phiên mã thì *v-onc* mới được hợp nhất vào trong các hạt retrovirus và đi vào các tế bào bên cạnh bằng thâm chuyển. Chẳng hạn như gen ung thư HPV-16 E6/E7 được lấy từ virus gây u nhú ở người và sự biểu hiện của chúng sẽ khởi đầu cho sự biến nạp tăng sản ung thư cũng như khẳng định kiểu hình ác tính của các tế bào ung thư cổ tử cung.

15.2.5 Các gen kiểm chế khối u

Các gen kiểm chế ung thư mã cho các phân tử làm cải biến sự tăng trưởng của các tế bào thông qua cơ chế điều hòa chu kỳ tế bào. Chỉ một bất thường trong gen ức chế khối u cũng làm mất một sản phẩm gen có chức năng và mất cảm với biến nạp ác tính. Vì thế sự hoàn trả chức năng gen ức chế khối u bằng GTL, đặc biệt trong giai đoạn ác tính sẽ có khả năng chuyển ngược lại thành kiểu hình tế bào bình thường. Sự hoàn trả chức năng gen kiểm chế khối u trong các tế bào ác tính có khả năng do “sự biến nạp ngược” của các tế bào ác tính để trở thành dạng không ác tính.

Bảng 15.3 Tóm tắt các gen kiểm chế khối u

Gen kiểm chế khối u	Locus gen
<i>p53</i>	17p
retinoblastoma, <i>rb</i>	13q
<i>BRCA-1</i>	17q
<i>NF1</i>	17q
Sự loại trừ trong ung thư kết tràng, <i>DCC</i>	18q
<i>MEN-1</i>	11p
<i>WT1</i>	11p

Có rất nhiều gen kiểm chế khối u (Bảng 15.3), nhưng đáng lưu ý nhất là retinoblastoma (rb) (u nguyên bào võng mạc) và p53. Chất kiểm chế khối u p53 là một phosphoprotein nhân- 393 amino acid, nó tác động như một yếu tố phiên mã bằng cách gắn vào các promoter DNA với phương thức đặc hiệu trình tự để kiểm soát sự biểu hiện của các protein có liên quan trong chu kỳ tế bào (pha G1/S). Chức năng của p53 như “người lính gác hệ gen” do ức chế chu kỳ tế bào thông qua sự tương tác với các phức hợp cyclin/CDK đặc hiệu hoặc cảm ứng apoptosis qua con đường *bax*, *fas*. Sự tác động này là để đáp ứng với những hư hại của DNA. Vì thế, bằng sự hoạt hóa p53, các tế bào ác tính hoặc tiền ác tính có thể bị ức chế hoặc bị tiêu diệt hay bị thực bào. Như vậy, nếu bị mất gen p53 do đột biến, loại bỏ hay ức chế phân tử kiểm chế khối u p53 đều liên quan tới sự tiến triển khối u. Sự bất hoạt p53 có thể xảy ra bằng nhiều cơ chế, bao gồm đột biến gen, loại bỏ nhiễm sắc thể, liên kết với các protein ung thư của virus, liên kết với các protein tế bào như *mdm2*, hoặc thay đổi sự định vị dưới tế bào của protein. Người ta đã xác định được rằng p53 bị biến đổi trong một số dạng ác tính ở người. Sự xuất hiện của các đột biến p53 đều gắn liền với các tiên lượng xấu hoặc bệnh có xu hướng phát triển và giảm độ nhạy cảm với trị liệu hóa học. Vì các lý do trên nên những người có p53 bất thường sẽ là các ứng cử viên tiềm năng của GTL.

15.2.6 Các gen sửa chữa DNA

Sự khiếm khuyết trong DNA chuỗi kép có thể được sửa chữa bởi sản phẩm của các gen sửa chữa DNA. Những gen này tác động vào quá trình đọc, sửa và hiệu chỉnh các trình tự cặp base của DNA ghép đôi không tương xứng. Những sai sót về base ghép đôi nếu không được hiệu chỉnh thì nó sẽ được sao chép khi phân chia tế bào và làm mất tính ổn định của hệ gen. Cho tới nay người ta đã biết 4 gen của động vật có vú là *hMHL1*, *hMSH2*, *hPMS1* và *hPMS2*. Những đột biến xảy ra ở những gen này sẽ tạo nên các sản phẩm gen khiếm khuyết như đã thấy ở hội chứng ung thư trực tràng không polyp di truyền dòng mầm (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) (HNPCC). Những đột biến ở gen *hMSH2* (locus ở nhiễm sắc thể 2p) và gen *hHLH1* (locus ở nhiễm sắc thể 3p) nhiều tài liệu ghi nhận là ở HNPCC, nơi có nhiều (khoảng 10 ngàn) sai sót soma (những biến đổi ngẫu nhiên trong các trình tự DNA). Vì thế, những đột biến trong các enzyme sửa chữa DNA có thể là cơ chế sinh ung thư do di truyền hoặc ung thư trong quá trình phát triển cá thể.

15.3 Gen trị liệu ung thư

Một chiến lược trong GTL ung thư là bồi thường lại một gen đột biến. Nếu một gen bị mất chức năng thông qua sự biến đổi gen thì có thể được bồi thường lại theo nhiều cơ chế. Đối với mất chức năng do gen kiểm chế khối u thì có thể được bồi thường bằng cách chuyển tới một gen bình thường trội hoặc hiệu chỉnh trực tiếp sự khiếm khuyết gen. Nếu một gen chịu tác động có xu hướng trở lại như một gen ung thư hay yếu tố tăng trưởng thì phải hướng tới việc loại bỏ gen hoặc điều hòa biểu hiện gen.

15.3.1 Tăng cường gen kiểm chế khối u

Các gen kiểm chế khối u là một lớp gen có sự phân biệt di truyền, liên quan tới sự kiểm chế tăng trưởng bất thường. Khi chức năng kiểm chế khối u của các protein bị mất thì sẽ làm mất sự kiểm chế tăng trưởng. Vì thế các gen kiểm chế ung thư được coi như là các gen ung thư bị thoái hóa. Các nghiên cứu về “họ ung thư” dẫn đến các hội chứng ung thư phân biệt đã xác định được rằng các gen kiểm chế ung thư đã bị đột biến ngay từ dòng mầm. Các cá thể trong họ này đều nhạy cảm hơn đối với ung thư, bởi vì họ chỉ mang một alen bình thường của gen nên chỉ cần một sự kiện đột biến là mất ngay chức năng kiểm chế khối u. Gen kiểm chế khối u đích nhất cho GTL là p53. Sở dĩ như vậy vì p53 là gen kiểm chế khối u thường hay bị đột biến nhất trong ung thư ở người. Khi chuyển gen p53 vào các tế bào khối u *in vitro* thì kết quả tải nạp là tăng sự kiểm chế, giảm hình thành các quần thể, giảm hoạt tính gen gây khối u của các tế bào và cảm ứng sự chết theo chương trình của tế bào. Tuy nhiên, các tế bào bình thường vẫn có biến đổi sau khi thâm chuyển và biểu hiện quá mức gen p53. Sự phát hiện này dẫn đến các công trình nền tảng xa hơn trong các thử nghiệm lâm sàng.

Các nghiên cứu lâm sàng với gen p53 đã được bắt đầu và dĩ nhiên còn nhiều chướng ngại cần phải vượt qua mới đi đến thành công trong trị liệu.

Như chúng ta biết có rất nhiều hệ thống chuyển gen cho các ứng dụng lâm sàng. Chúng ta hãy lướt qua đôi nét về hệ thống này.

15.3.1.1 Retrovirus

Đối với các retrovirus, lợi thế đáng kể là hợp nhất được gen chuyển p53 vào trong các tế bào khối u phân chia nhanh hơn các tế bào bình thường. Tuy nhiên, sự hợp nhất này là hợp nhất hệ gen vì vậy nó là sự cải biến vĩnh viễn trong các tế bào và người ta không thể bớt giảm khả năng đột biến ghép của các tế bào bình thường với gen chuyển p53. Các retrovirus còn một hạn chế là được sản xuất với độ chuẩn thấp và ít ổn định. Vì thế việc cải biến nâng cấp các vec tơ retrovirus thế hệ đương thời là cần thiết cho việc trị liệu với p53 *in vitro* hoặc *ex vivo* đạt hiệu quả.

Bảng 15.4 Gen trị liệu với yếu tố kiểm chế khối u - p53

Loại ung thư	Vec tơ	Dòng tế bào/ghép ngoại lai	Hiệu ứng
Ung thư vú	Adenovirus	MDA-MB; SK-BR-3; BT-549 T47-D; HBL-100; MCF-7 SkBr3; 184 BS; MCF10	Giảm tăng sinh và sự hình thành quần thể, chết theo chương trình của tế bào
	Retrovirus	MDA-MB; BT549	Giảm hình thành quần thể
	Adenovirus Liposome	MDA-MB MDA-MB; MCF-7	Ức chế tăng trưởng 71-95% Ức chế tăng trưởng 40-75% trong ghép ngoại lai
Ung thư buồng trứng	Adenovirus	SK-OV3; 2774; Cao3,4 PA-1	Giảm tăng sinh và hình thành quần thể trong các tế bào

	Adenovirus	SK-OV3	Nhạy cảm hóa với bức xạ và tăng sự sống sót trong ghép ngoại lai
Ung thư cổ tử cung	Adenovirus	HeLa; C33A; HT3; C4-1 SiHa; Caski; ME180; MS751	Giảm tăng sinh và hình quần thể trong các tế bào
	Adenovirus	C33A; HT3; HeLa; SiHa; ms751	Kiểm chế khối u 100% trong ghép ngoại lai
Ung thư tuyến tiền liệt	Adenovirus	C4-2; DU-145; PC-3; LNCaP; DuPro-1;Tsu-Prt	Giảm tăng sinh và tăng apoptosis trong tế bào
	Adenovirus	C4-2; DU-145; PC-3; Tsu-Prt	Ức chế khối u 100% trong ghép ngoại lai
Ung thư phổi	Adenovirus	H23,69, 266Br, 322, 358, 460 596, H661; Calu-6; MRC-9; a549; wi-38	Giảm tăng sinh tế bào
	Retrovirus	H226Br; 322, 358, 460; wt226	Giảm tăng sinh tế bào
	Adenovirus	H1299, 69, 358, 226Br	Ức chế tăng trưởng cùng với giảm sự sống sót trong ghép ngoại lai
Ung thư đầu và cổ	Adenovirus	Tu-138, 177; MDA 686-LN; TR146; MDA 886; CNE-1, 2Z	Giảm tăng sinh và tăng apoptosis trong các dòng tế bào
	Adenovirus	Tu138, 177, MDA866, 686-LN	Kiểm chế khối u 67–100% trong ghép ngoại lai ; apoptosis trong khối u
Ung thư hệ thần kinh	Adenovirus	G55, 59, 112, 124,; U87 MG; SK-N-MC; SN-N-SH; U-251; T-98; U-87, 373 MG, 138MG; A-172; LG; EFC-2; D54 MG; T98G	Giảm tăng sinh và tăng apoptosis trong các dòng tế bào
	Retrovirus	A673	Giảm hình thành quần thể trong các tế bào
	Adenovirus	G122	Kiểm chế khối u 100%trong ghép ngoại lai
	Retrovirus	A673	Kiểm chế khối u

Ung thư bàng quang	Adenovirus	HT-1376; 5637; J82; FHs738b1	Giảm tăng sinh tế bào
Ung thư trực tràng	Adenovirus	DLD-1; HCT116; SW480, 620; RKO; KM12L4; SW837; Colo 205, 320; EB	Giảm tăng sinh, tăng apoptosis trong các dòng tế bào
	Adenovirus	DLD-1; SW620; KM1214	Ức chế tăng trưởng và tăng apoptosis trong ghép ngoại lai
Ung thư gan	Adenovirus	Hep3B, G2; HLE; HLF; SK-HEP-1	Giảm tăng sinh tế bào
	Adenovirus	McA-RH7777	Ức chế tăng trưởng trong ghép ngoại lai
Ung thư da	Adenovirus	SK-MEL-24 SK-MEL-24	Giảm tăng sinh tế bào Tăng ức chế trong ghép ngoại lai
Ung thư cơ	Adenovirus	A673, SK-UT-1	Giảm tăng sinh tế bào
Ung thư xương	Adenovirus	Saos-2	Giảm tăng sinh và tăng apoptosis tế bào
	Retrovirus	Saos-2	Giảm tăng sinh và hình thành quần thể trong các tế bào
	Adenovirus	Saos-2	Kiểm chế khối u 100% trong ghép ngoại lai
	Retrovirus	Saos-2	Kiểm chế khối u 100%- ghép ngoại lai
	Adenovirus	Saos-2	Kiểm chế khối u 100%- ghép ngoại lai
U lympho	Adenovirus	JB6; k-562	Giảm hình thành quần thể trong các tế bào
	Retrovirus	Be-13	Giảm tăng sinh và hình thành quần thể trong các tế bào
	Virus ngur Ậu	HL-60	Giảm tăng sinh, tăng apoptosis và biệt hóa trong các tế bào

15.3.1.2 Adenovirus và virus adeno liên hợp

Các hệ thống chuyển gen có cơ sở là adenovirus, virus adeno liên hợp, herpes và virus nguru đậu đã được khai thác cho GTL. Với GTL người ta đã sử dụng gen chuyển p53, adenovirus và virus nguru đậu. Những lợi thế đáng kể của các vectơ này là: (1) tải nạp được các tế bào đang phân chia hoặc nằm yên, (2) tính hướng mô rộng và (3) có khả năng tạo ra các chất liệu lâm sàng với nồng độ cao. Các adenovirus còn duy trì ngoài nhiễm sắc thể vì thế sự chuyển gen tức thì có thể xảy ra với các adenovirus tái tổ hợp khiếm khuyết sao chép. Sự biểu hiện ngắn hạn của p53 có thể là một lợi thế cho việc xử lý sự tạo u nếu nó cảm ứng ức chế tăng sinh, giảm sự hình thành quần thể hoặc giảm hoạt tính tạo khối u ác tính trong các tế bào ung thư đích. Chắc chắn là nếu apoptosis được cảm ứng bởi sự biểu hiện tức thời của p53 thì những tế bào khối u của cơ thể sẽ loại bỏ sự phân dòng. Một khó khăn phức tạp của trị liệu sẽ là việc quan sát các quá trình sinh học này trong các tế bào bình thường. Tuy nhiên, các adenovirus khiếm khuyết sao chép cũng đã được sử dụng trong các nghiên cứu lâm sàng, nhưng chưa thấy các tác dụng phụ trái ngược đáng kể nào với các tế bào bình thường. Một vấn đề khác trong việc sử dụng adenovirus là sự đáp ứng miễn dịch của vật chủ đối với vec tơ. Cả kháng thể trung hòa và các tế bào T độc tế bào đều làm ức chế hiệu quả của GTL cơ sở adenovirus. Các thể hệ gần đây nhất của các vec tơ adenovirus đã đề cập một cách đặc biệt vấn đề này và đã làm giảm đáng kể tính sinh miễn dịch của các cấu trúc vec tơ.

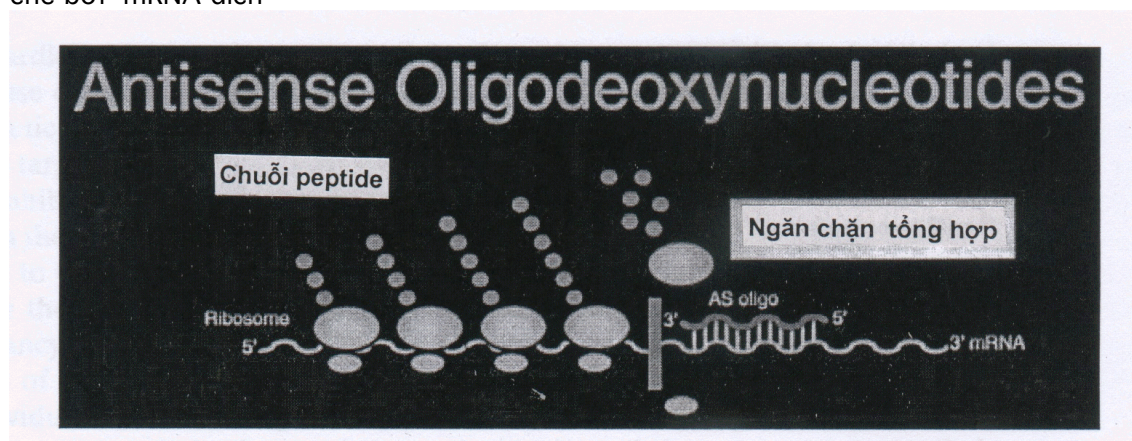
15.3.1.3 Các hệ thống chuyển gen không phải là virus

p53 có thể được sử dụng cùng với liposome hay là tiêm trực tiếp DNA của p53. Mặc dầu là ít hiệu quả, nhưng cả hai hệ thống này đều ít độc tính và tính sinh miễn dịch cũng ít hơn các hệ thống virus. Các liposome cho cơ hội tốt nhất trong các trường hợp ác tính di căn thông qua khả năng đặc hiệu của nó đối với các tế bào tạo u. Nó có hiệu ứng cao nhất do sự hợp nhất của các tế bào đích như các kháng thể với các kháng nguyên đặc hiệu khối u trong lớp lipid trung tâm của liposome. Các liposome được tạo ra từ các phosphatidylcholine truyền thống có thể chuyển các gen tới các cơ quan tử nội bào đặc hiệu bởi vì chúng không hòa vào nhau nhiều và lại kháng acid. Vì vậy các liposome có thể đi đường vòng qua các quá trình nội bào để chuyển gen tới nhân. Trong GTL, việc chuyển các gen trị liệu bằng liposome cũng có thể có kết quả trong việc làm ức chế sự tạo mạch và nâng cao hiệu quả qua hiệu ứng “người ngoài cuộc” (bystander). Cả 2 sự kiện này đều lợi thế cho trị liệu các khối u di căn.

15.3.2 Làm bất hoạt biểu hiện quá mức các gen ung thư

Sự biểu hiện quá mức các gen ung thư có thể được gạt bỏ bằng cách giới hạn lại sự biểu hiện gen của chúng. Sự ức chế đặc hiệu có thể được thực hiện bằng việc sử dụng các phân tử antisense hoặc ribozyme. Antisense oligonucleotide được sản sinh ra một cách đặc biệt trên cơ sở trình tự có nghĩa (sense) của một gen ung thư có thể gắn được vào các gen ung thư. Đích của các phân tử antisense oligonucleotide thường là vị trí khởi đầu phiên dịch hoặc vị trí ghép nối trên gen (hình 15.4). Sự gắn kết này đại diện cho cách tiếp cận của một antigeen ức chế dòng thông tin di truyền (DNA-RNA-protein). Cách tiếp cận antigeen dựa trên cơ sở đích DNA hệ gen, gồm 2 bản phiên mã gen ung thư. Sự ức chế biểu hiện gen đạt được là nhờ hình thành một cặp ba (triplex) (gồm phân tử antisense và cặp đôi DNA chuỗi kép). Với sự hình thành một cặp ba ổn định thì sự phiên dịch của RNA

gen ung thư sẽ bị ức chế. Cần phải lưu ý rằng, sự hình thành cặp ba dựa cơ sở cặp đôi của các base ổn định về động học và vì thế phải lưu ý tới chức năng của sự bổ cứu và chiều dài của phân tử antisense. Sự ức chế biểu hiện gen của antisense có thể xảy ra ở các vị trí phiên mã khác thông qua các protein điều hòa (sense và aptamer, Bảng 15.5). Nếu đích là các yếu tố phiên mã và các protein điều hòa nhân khác thì sẽ thúc đẩy sự biểu hiện gen. Cách tiếp cận cuối cùng với antisense ức chế biểu hiện gen là hướng vào các sự kiện khi phiên dịch và sau phiên dịch. Sự phiên dịch RNA thành protein có thể được ức chế bởi mRNA đích



Hình 15.4 Mô hình một antisense oligonucleotide đặc hiệu được sản sinh ra từ một trình tự của một gen ung thư, nó gắn vào gen ung thư và làm cảm ứng ngăn chặn sự tổng hợp RNA polymerase (được vẽ như một vòng chữ nhật lớn).

(Theo Simon J. Hall, Thomas F. Kresina, Richard Trauger và Barbara A. Conley. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

nhờ một antisense oligonucleotide. Chiến lược này đối với trị liệu ung thư còn nhiều thách thức hơn nữa, bởi vì có rất nhiều phân tử mRNA cho một gen ung thư trong một tế bào ác tính.

Đối với bất kỳ antisense nào cũng cần hoàn tất 3 bước trước khi được sử dụng. Trước nhất phải thiết lập được cơ sở gen của sự gây ung thư. Thứ hai là xác định trình tự đặc hiệu cho sự ức chế của antisense. Mặc dầu cơ sở di truyền của sự gây ung thư đã được xác định khá rõ ràng thông qua nhiều bước hình thành khối u, nhưng bằng con đường công nghệ di truyền đặc hiệu để tạo ra được một gen ung thư vẫn là cần thiết. Điều quan trọng là phải xác định được một số biến đổi di truyền xảy ra ở trình tự tiến tới ác tính. Việc xác định những biến đổi di truyền bao hàm chiến lược chẩn đoán phân tử nhằm quản lý lâm sàng những người bị ung thư. Hơn nữa, những biến đổi di truyền tương ứng gây nên ung thư cũng phải được thiết lập. Việc xác định gen ung thư là cần thiết để xác định xem antisense nào là thích hợp nhất. Với các đích đã được xác định thì trình tự nucleotide đặc hiệu rất cần thiết cho việc sản xuất các antisense. Những ví dụ điển hình về trị liệu gen antisense là ung thư vú, u tuyến tụy, ung thư kết tràng. Tiến trình lâm sàng của ung thư vú phải được xác định ngay từ giai đoạn sớm cho tới lúc đã di căn xa. Những yếu tố triệu chứng về sự kiện này là rất quan trọng giúp ta phân biệt được các ung thư di căn để có các trị liệu hỗ trợ. Trên bảng (15.2) cho thấy gen ung thư *erb* có liên quan với ung thư vú. Sự khuếch đại và biểu hiện quá mức gen ung thư *erb* được thể hiện qua việc mất kiểm soát tế bào đối với sự sao chép DNA, sự sửa chữa và tách rời NST. Phạm vi của

những biến đổi tế bào này được xác định bởi số lượng gen ung thư. Khi quan sát thấy các tế bào khối u có một bản phiên mã gen ung thư cao hơn thì xu hướng sẽ tiến di căn và kết quả trị liệu lâm sàng sẽ thấp. Một quan sát tương tự có thể thực hiện được ở ung thư tuyến tụy. Mặc dầu các tế bào từ các khối u di căn đã được làm bất hoạt bởi gen kiểm chế khối u p53, loại bỏ nhiễm sắc thể 18q và các đột biến điểm ở mã 12 của gen *K-ras*, nhưng sự biểu hiện quá mức của gen ung thư *rhoC* vẫn tương quan đáng kể với các triệu chứng dự đoán. Vì thế, đích tốt nhất của trị liệu gen antisense trong ung thư là các gen ung thư biểu hiện quá mức giữ vai trò quan trọng trong bệnh sinh.

Có nhiều gen ung thư là đích cho trị liệu gen antisense như *c-fos* cho ung thư não, *c-srs* cho ung thư kết tràng, *c-myb* cho bệnh bạch cầu và các khối u của hệ thần kinh trung ương cũng như *c-myc* cho u hắc sắc tố và ung thư buồng trứng. Ức chế biểu hiện gen ung thư đích đã được ghi chú trong từng trường hợp ở các dòng tế bào và trong ghép ngoại lai ở chuột thiếu hụt miễn dịch (*nude*, SCID). Đi cùng với giảm biểu hiện gen là các hiệu ứng sinh học như điều hòa xuống sự biểu hiện yếu tố tăng trưởng hoặc tăng độ nhạy cảm của các tế bào khối u với hóa trị liệu. Nếu làm giảm sự biểu hiện của một yếu tố tăng trưởng như yếu tố tăng trưởng mạch máu nội mô hoặc yếu tố tăng trưởng biến nạp β thì sẽ có hiệu ứng đáng kể đối với sự tạo mạch và tăng trưởng khối u. Việc sử dụng antisense đối với *c-fos* ở não đã làm thay đổi chức năng thần kinh cũng như hành vi của bệnh nhân. Với các trường hợp làm tăng độ nhạy cảm của các tế bào khối u với hóa trị liệu thì việc giảm tăng sinh khối u và sự hình thành quần thể đã chứng minh rằng GTL antisense đã làm tăng tính kháng u đặc hiệu của thuốc và coi như một “trị liệu tổ hợp”.

Sự hấp thu tế bào của antisense oligodeoxyribonucleotide là yếu tố làm giới hạn hiệu ứng trị liệu. Trong các nghiên cứu trên động vật, khi đưa liposome qua tĩnh mạch đã làm tăng sự hấp thu. Vì thế các thể hệ có bổ sung của antisense là rất cần thiết và được coi như các kỹ thuật chuyển giao mới. Mở rộng công nghệ antisense là việc sử dụng ribozyme – các phân tử antisense RNA có hoạt tính xúc tác (Hình 15.5). Xin nhắc lại rằng, chức năng của ribozyme là gắn vào bán phần RNA đích thông qua lai đặc hiệu trình tự antisense. Sự bất hoạt của các phân tử đích xảy ra là do phân cắt khung phosphodiester ở một vị trí đặc hiệu. Hai lớp ribozyme được nghiên cứu kỹ nhất là ribozym hammerhead và ribozyme hairpin. Ribozyme hammerhead cắt RNA ở trình tự nucleotide U-H (H = A, C hoặc U) do thủy phân liên kết 3'-5' phosphodiester. Ribozyme hairpin cắt ở các trình tự nucleotide C-U-G. Lợi thế nổi bật của ribozyme hơn hẳn antisense RNA truyền thống là nó không bị tiêu hao khi xảy ra phản ứng phân cắt đích. Vì thế, một ribozyme đơn có thể làm bất hoạt được nhiều phân tử đích ngay ở nồng độ thấp. Thêm vào đó, ribozyme có thể được sản sinh ra từ các đơn vị phiên mã rất nhỏ, vì thế ribozyme có thể hướng đích tới các vùng khác nhau của hệ gen ung thư. Các ribozyme còn có tính đặc hiệu trình tự cao hơn antisense RNA bởi vì đích của nó phải thật chuẩn xác với trình tự đích cho phép gắn. Hơn nữa, vị trí phân cắt phải ở phía bên phải trong đoạn antisense.

Ribozyme

The diagram illustrates the catalytic mechanism of a ribozyme. It shows a substrate RNA strand (5' to 3') with a specific sequence (NNRC...N-3') and a catalytic RNA strand (3' to 5') with a specific sequence (3'-AU-ANNYG...VN-5'). The catalytic strand is shown in a folded state, with its 3' end (VN) positioned to cleave the substrate RNA. The cleavage site is indicated by a wavy line and the label 'Vị trí cắt' (Cleavage site). The substrate RNA is labeled 'Cơ chất RNA' (RNA substrate). The diagram shows the substrate RNA being cleaved into two fragments: 5'-NNRC...N-3' and 5'-GHYBNNNNN-3'.

(Theo Simon J. Hall, Thomas F. Kresina, Richard Trauger và Barbara A. Conley. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Một phương pháp khác hiệu chỉnh hiệu ứng biểu hiện quá mức gen ung thư là sự can thiệp của những cải biến sau phiên dịch các sản phẩm gen ung thư để chúng có được các chức năng cần thiết. Chẳng hạn như, các gen ung thư *ras* như đã đề cập ở trên, nó biểu hiện quá mức trong nhiều khối u. Tuy nhiên, để được hoạt hóa thì *ras* phải di rời từ tế

bào chất tới màng sinh chất, vì thế việc thêm nhóm farnesyl (nhờ xúc tác của farnesyl transferase) vào protein *ras* là cần thiết để cho phép *ras* định vị được trên màng. Ngày nay người ta đã phát triển các farnesyl transferase có thể bị ức chế bởi một số tricyclic và các hợp chất khác. Sự ức chế này dẫn đến kết quả là chẳng những ức chế sự tăng trưởng *in vitro* mà còn ức chế tăng trưởng các khối u trong các mô hình động vật về sự tạo u. Sự ức chế này cũng gây độc tính nhẹ với các tế bào bình thường. Cũng giống như trị liệu antisense, dường như các chất ức chế farnesyl transferase có thể làm tăng hiệu ứng của các thuốc trị liệu hóa học gây độc tế bào. Tuy nhiên, những tác nhân như thế có thể lại là hữu ích và được coi như là các tác nhân phòng ngừa hóa học cho các bệnh nhân có rủi ro cao vì khối u biểu hiện quá mức *ras*.

Bảng 15.6 Ứng dụng của trị liệu ribozyme đối với ung thư trên người

Vec tơ	Promoter	Gen ung thư đích	Các tế bào ung thư
<i>Plasmid</i>			
pHΔApr-1 neo	β-actin	H- <i>ras</i> K- <i>ras</i> c- <i>sis</i>	Bàng quang và u hắc sắc tố Tuyến tụy U trung biểu mô
pMAMneo	MMTV-LTR	H- <i>ras</i> c- <i>myc</i> c- <i>fos</i>	U hắc sắc tố U hắc sắc tố U hắc sắc tố & buồng trứng
pLNCX	CMV	H- <i>ras</i>	U hắc sắc tố và tuyến tụy
pLNT	Tyrosinase	H- <i>ras</i>	U hắc sắc tố
pRc	CMV	Pleiotrophin	U hắc sắc tố
<i>Adenovirus</i>			
	CMV	H- <i>ras</i> K- <i>ras</i>	U hắc sắc tố Tuyến tụy
<i>Retrovirus</i>			
	β-actin	bcr/abl	CML
	thymidine kinase	bcr/abl	CML
<i>Liposome</i>			
<i>Lipofection</i>			
		bcr/abl	CML
		AML1/MTG8	AML

15.3.3 Trị liệu với tiền thuốc đích (targeted prodrug)

GTL với tiền thuốc đích chống ung thư là chuyển trực tiếp vào khối u một gen để hoạt hóa một tiền thuốc không độc thành một sản phẩm độc tế bào nhờ sử dụng các promoter đặc hiệu mô trong các vec tơ virus (Bảng 15.7). Cách tiếp cận này đạt độc tính tối đa ở vị trí chuyển giao vec tơ, còn ở những tế bào xa hơn thì độc tính sẽ thấp hơn. Trên động vật, một số tiền thuốc hoạt hóa enzyme thể hiện hiệu ứng kháng khối u cao. Tuy nhiên, với các khối u ở người rất hiếm các enzyme hoạt hóa tiền thuốc tương tự như vậy. Trị liệu với tiền thuốc enzyme trực tiếp gen (gene – directed enzyme prodrug therapy – GDEPT) nhằm tiêu diệt các tế bào khối u thông qua việc hoạt hóa một tiền thuốc sau khi gen này đã mã một enzyme hoạt hóa hướng đích tới một tế bào ác tính (H 15.6). Hệ thống tiền thuốc/ enzyme đặc hiệu đã được nghiên cứu cho trị liệu ung thư bằng GDEPT. Kỹ thuật này đòi hỏi các tiền thuốc phải có cơ chế hoạt động không gây độc tính và có

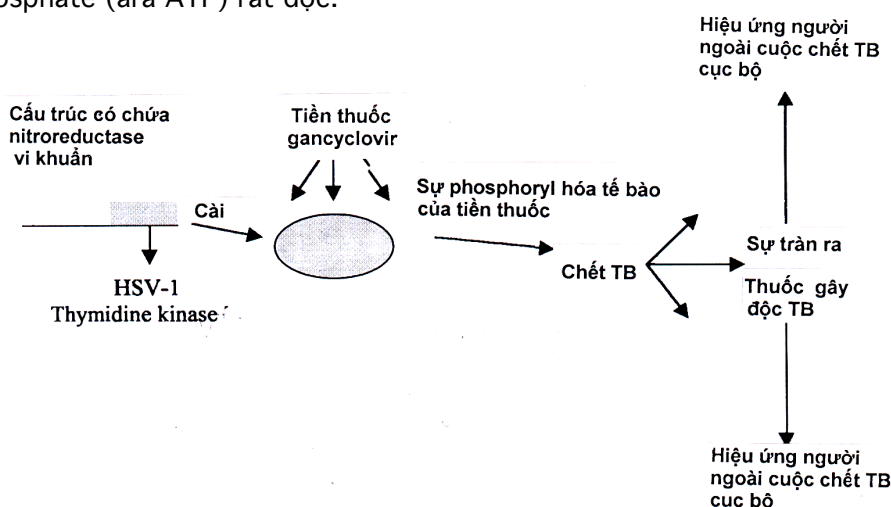
thể chuyển đổi ngược nội bào thành các chất chuyển hóa gây độc tế bào cao nhưng lại không đặc hiệu với chu kỳ tế bào (không ảnh hưởng tới chu kỳ tế bào). Thuộc tính hoạt hóa này sẵn sàng thúc đẩy hiệu ứng “người ngoài cuộc” (bystander). Vì thế, các tế bào không được tải nạp nằm cạnh có thể bị giết chết bởi các chất chuyển hóa có độc tính vừa mới được tạo thành. Hợp chất tốt nhất hợp với những tiêu chuẩn này là các tác nhân alkyl hóa như nitroreductase vi khuẩn. Hệ thống ganciclovir/gen thymidine kinase của virus herpes simplex (herpes simplex virus thymidine kinase –HSVtk) thường hay được dùng nhất trong GDEPT- HSVtk, nhưng thymidine kinase của động vật có vú thì không thể phosphoryl hóa ganciclovir thành ganciclovir triphosphate được. Ganciclovir triphosphate ức chế tổng hợp DNA bằng sự tác động của một chất tương tự thymidine; nó hợp nhất vào DNA để ngăn cản sự tổng hợp DNA. Ngoài hiệu ứng gây độc tế bào trực tiếp trên các tế bào tải nạp HSVtk được xử lý với ganciclovir, cách tiếp cận này còn tạo ra hiệu ứng người ngoài cuộc làm cho các tế bào bên cạnh không biểu hiện HSVtk cũng bị chết theo. Điều này xảy ra do sự dịch chuyển của ganciclovir đã phosphoryl hóa từ các tế bào tải nạp HSVtk tới các tế bào bên cạnh không biểu hiện qua khớp và/hoặc thông qua việc sản sinh ra các bong apoptosis gần các tế bào kề cận. Các bong này có thể chứa các enzyme HSVtk, ganciclovir đã hoạt hóa, các cytokine hoặc các phân tử tải nạp tín hiệu như *bax*, *bak* hoặc cyclin. Ngoài ra, hiệu ứng người ngoài cuộc có thể làm tăng hoạt tính miễn dịch cục bộ và thúc đẩy tiêu diệt các tế bào khối u còn tồn tại. Bất kể cơ chế thế nào thì hiệu ứng người ngoài cuộc đã cho phép tiêu diệt một cách hiệu quả các tế bào khối u mà không cần phải xử lý từng tế bào ác tính.

Bảng 15.7 Các promoter được sử dụng để biểu hiện gen đích trong GTL ung thư

Các tế bào ung thư	Promoter
Ung thư tuyến sữa và ung thư vú	MMTV-LTR; WAP-NRE; κ -casein; SLP1; DF3(MUC1); <i>c-erbB2</i>
U nguyên bào thần kinh và u nguyên bào đệm U hắc sắc tố	Calcineurin A α ; synapsin 1; HSV-LAT Tyrosinase; <i>TRP-1</i>
Bệnh bạch cầu tế bào B	Chuỗi nặng Ig và chuỗi nhẹ κ ; yếu tố tăng cường chuỗi nặng Ig
Ung thư phổi	Yếu tố đáp ứng <i>CEA</i> ; <i>SLP1</i> ; <i>Myc-Max</i>
Ung thư kết tràng	<i>CEA</i> ; <i>SLP1</i>
Ung thư gan	<i>AFP</i>
Ung thư tuyến tiền liệt	<i>PSA</i>
Ung thư tuyến tụy	<i>c-erbB2</i>
Ung thư xương và sụn	<i>c-sis</i>

Việc xử lý bằng ganciclovir đối với các tế bào bệnh bạch cầu người nhiễm HSVtk ức chế được sự tăng trưởng của tế bào. Cả các tế bào ung thư phổi và tế bào đã di căn ở gan chuột (trong mô hình *in vivo* của ung thư di căn) đều bị tiêu diệt *in vivo* sau thâm nhiễm. Các tế bào khối u gan đã xử lý thành công *in vitro* với thymidine kinase của virus varicella –zoster (varicella –zoster virus thymidine kinase –VZVtk), nó chuyển ngược

methoxypurine arabinonucleoside (ara M) không độc thành adenine arabinonucleoside triphosphate (ara ATP) rất độc.



Hình 15.6 Trị liệu tiền thuốc enzyme trực tiếp gen (GDEPT)

(Theo Simon J. Hall, Thomas F. Kresina, Richard Trauger và Barbara A. Conley. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Thắng lợi của các nghiên cứu này đã dẫn đến nhiều thử nghiệm lâm sàng với việc sử dụng HSVtk. Mặc dầu sự kiểm chế tăng trưởng khối u đã được dẫn chứng rõ ràng trong các nghiên cứu này nhưng vẫn chưa hé mở khả năng cứu chữa được bệnh nhân. Đường như là có sự biến thiên hiệu ứng người ngoài cuộc *in vivo* do hiệu ứng tải nạp bị giới hạn *in vivo*. Tuy nhiên, việc sử dụng HSVtk đã làm tăng tính nhạy cảm đối với hóa trị liệu, vì thế mà chứng minh được vai trò của trị liệu tiền thuốc khi kết hợp cùng với các thuốc kháng khối u.

Một hệ thống tiền thuốc bổ sung đã được nghiên cứu rộng rãi là gen cytosine deaminase (CD) của *E.coli* cộng với 5-fluorocytosine (5-FC). Gen CD sẽ chuyển ngược 5-FU thành tác nhân hóa trị liệu 5-fluorouracil (5-FU). 5-FU là thuốc điều trị chuẩn cho các khối u dạ dày - ruột non (gastrointestinal -GI) đã di căn và dùng làm test cho hệ thống tiền thuốc. Trị liệu hệ thống với 5-FU sẽ kiểm chế sự tăng sinh của các tế bào khối u tải nạp CD. Vì thế chiến lược cho các khối u GI di căn ở gan hướng vào việc chuyển giao giới hạn vùng các CD tới các khối u lớn. Để việc chuyển giao đặc hiệu mô tới gan, các promoter của kháng nguyên phôi hoặc các gen α -fetoprotein đang được thăm dò với việc truyền các vec tơ CD qua động mạch gan. Tuy nhiên, các khối u đặc hiệu lại kháng lại với sự xử lý lặp lại của 5-Fu, vì thế cần phải có sự can thiệp thêm về phương pháp luận.

15.3.4 Cải biến đáp ứng miễn dịch kháng u

15.3.4.1 Miễn dịch khối u qua trung gian tế bào

Việc sản sinh tính miễn dịch đặc hiệu tế bào T độc tế bào được xác nhận trên (1) khả năng nhận dạng một tế bào gây bệnh của các tế bào CD8 và (2) sự hoạt hóa và mở rộng

tiếp theo của các tế bào CD8 đặc hiệu kháng nguyên. Việc lựa chọn và hoạt hóa của tế bào với tính đặc hiệu chuẩn xác đối với kháng nguyên đặc hiệu xảy ra ở hạch lympho. Tại đây, các tế bào T sẽ tương tác với các tế bào trình diện kháng nguyên như các tế bào phân nhánh (dendritic). Các tế bào phân nhánh chủ yếu tới hạch lympho sau khi gặp các tế bào gây bệnh ở ngoại biên. Các tế bào phân nhánh phù hợp đặc biệt với chức năng này bởi vì chúng biểu hiện cả những các phân tử MHC lớp I và II mà cả những phân tử đồng kích thích đặc hiệu như B7.1, B7.2, CD40L, ICAM1,2,3, VCAM-1 và LFA-3. Với sự nhận dạng và hoạt hóa đặc hiệu của các tế bào T, các dòng tế bào sẽ di rời khỏi hạch và tiến thẳng tới vị trí của các tế bào gây bệnh. Khi các tế bào T đã được hoạt hóa, bây giờ chúng chỉ còn nhiệm vụ là phải biết nhận dạng. Vấn đề này xảy ra thông qua việc chuyển đi các tín hiệu giống nhau bởi hệ thống hòa hợp tổ chức chính (major histocompatibility - MHC) của các tế bào trình diện kháng nguyên (antigen-presenting cell - APC). Các tế bào tăng sản ung thư hiện hữu một thách thức đặc biệt đối với hệ thống này, bởi vì các tế bào này không có các phân tử đồng kích thích cần để hoạt hóa hữu hiệu các tế bào T độc tế bào. Ngoài ra còn thấy rằng việc chuyển giao tín hiệu MHC nếu không có đồng kích thích thì có thể sẽ làm suy yếu tế bào và đó là cơ chế mà các tế bào khối u tránh được sự tấn công miễn dịch. Một cách tiếp cận khác lại nhằm vào việc khắc phục sự cố thiếu các phân tử đồng kích thích là tải nạp các tế bào khối u với các phân tử đồng kích thích để cho chúng có chức năng trực tiếp như các APC. Những tế bào này có thể được xử lý trực tiếp tới vật chủ như là các vaccine, hoặc được cải biến *in vivo* thông qua việc tiêm vào trong khối u gen của phân tử đồng kích thích. Đã có nhiều báo cáo về thành công của cách tiếp cận này trong các mô hình trên động vật. Mặc dầu vậy, cũng có một số báo cáo về các tế bào B7.1 cải biến lại không cảm ứng tính miễn dịch đặc hiệu khối u. Mặc dầu vậy, các thử nghiệm lâm sàng vẫn được khởi đầu với các khối u tải nạp B7.1 trong các bệnh nhân u hắc sắc tố và ung thư kết tràng. Những kết quả đạt được tới nay đã chứng minh được rằng việc sử dụng các tế bào khối u đã được chiếu xạ và tải nạp với B7.1 như các vaccine có thể làm tăng ĐUMD kháng u. Mặc dầu vậy, sự thích ứng lâm sàng của hiệu ứng này cần phải được chứng minh. Một cách tiếp cận khác lại nằm vào việc làm tăng khả năng của các tế bào khối u với chức năng như APC là tải nạp kháng nguyên hòa hợp tổ chức chính không thích ứng di truyền vào trong tế bào. Hiệu ứng rõ ràng nhất của sự thâm chuyển này là tạo được một đáp ứng allo (allo-response) mạnh quanh khối u, vì thế mà cảm ứng sự di rời và hoạt hóa của cả APC và các tế bào T. Ngoài ra, việc sản xuất IL-2 cục bộ từ các tế bào T tuyển mộ sẽ khuếch đại xa hơn đáp ứng viêm cục bộ. Các thử nghiệm lâm sàng với cách tiếp cận này đã đạt nhiều tiến bộ trong các bệnh nhân u hắc sắc tố.

15.3.4.2 Các cytokine

Cytokine là các protein được tiết ra bởi các tế bào miễn dịch, tác động như các chất trung gian (mediator) mạnh đối với ĐUMD. Những nghiên cứu lâm sàng cho thấy các phân tử này có độc tính mạnh khi được chuyển tới các hệ thống với liều lượng cao. Vì thế việc mở rộng nghiên cứu về cytokine và ung thư, dùng GTL để chuyển các gen cytokine tới các tế bào khối u tức là tạo nên một môi trường xung quanh tế bào, làm thuận lợi cho việc tiêu diệt chúng. Cho tới nay, vấn đề này đã được hoàn tất thông qua việc chuyển giao virus với các cấu trúc adenovirus hay retrovirus hoặc các lipid cationic. Cũng có thể chuyển trực tiếp cytokine vào các khối u hoặc vào các tế bào khối u *ex vivo*. Thực tế là

tất cả cytokine được nghiên cứu đều thể hiện có hiệu ứng với sự tăng trưởng khối u và sự sống sót của tế bào trong một số mô hình trên động vật. Trong hầu hết các trường hợp, tác động của các cytokine tới khối u chỉ giới hạn ở một số nhỏ tế bào, điều đó chứng tỏ rằng tác động của cytokine lên ĐUMD kháng lại khối u không chỉ đơn giản là việc tiêu diệt các tế bào thâm chuyển mà nó còn đóng góp to lớn vào việc hoạt hóa và sự tồn tại của các tế bào miễn dịch kháng khối u ở trong và xung quanh khối u. Tuy nhiên, cũng có thể là cảm ứng đáp ứng viêm tại vị trí viêm đã làm hoạt hóa nhiều dạng tế bào ở vị trí u. Ngoài ra, việc chuyển các cytokine tới các tế bào khối u ex vivo đã nâng cao tính miễn dịch của các tế bào khối u và mở cửa cho việc sử dụng các tế bào khối u đã được cải biến gen như là các vaccine.

Bảng 15.8 Các cytokine, các phân tử phụ trợ và các yếu tố tăng trưởng được thâm chuyển để làm tăng tính miễn dịch

Cytokine	Hoạt tính sinh học	Hệ thống khối u
IL-2	Yếu tố tăng trưởng tế bào T và mở rộng CTL	Não, vú., kết tràng, phổi các tế bào nhỏ, u hắc sắc tố, buồng trứng
IL-4	Yếu tố tăng trưởng tế bào T và B	Ung thư tiến triển, não
IL-7	Hoạt hóa CTL, điều hòa xuống TGF- β	U Kết tràng, u lympho, u hắc sắc tố, u thận
IL-12	Hoạt hóa đáp ứng Th1, hoạt hóa CTL	Ung thư tiến triển, u hắc sắc tố
IFN	Hoạt hóa các tế bào CD8, hoạt hóa đại thực bào, điều hòa lên biểu lộ MHC lớp I và II	U hắc sắc tố, tuyến tiền liệt, não
GM-CSF	Hoạt hóa các tế bào phân nhánh, hoạt hóa đại thực bào	Thận, tuyến tiền liệt, u hắc sắc tố

Bảng 15.8 liệt kê các cytokine đã được nghiên cứu trong các thử nghiệm lâm sàng. Như chúng ta đã thấy, phần lớn các thử nghiệm đều sử dụng IL-2. Đây là một polypeptide gồm 133 amino acid, trước kia gọi là yếu tố tăng trưởng tế bào T, nó là một cytokine sơ cấp được tạo ra bởi các tế bào CD4 hoạt hóa. IL-2 tác động có tính chất cục bộ ở vị trí ĐUMD nhằm mở rộng quần thể các tế bào CD8 hoạt hóa. Các tế bào T như thế có thể được hồi phục trực tiếp từ các khối u rồi dần dần chuyển thành các lympho thấm nhập khối u (tumor-infiltrating lymphocyte – TIL). Ngoài ra, IL-2 cũng có thể làm mở rộng các tế bào diệt tự nhiên (natural killer –NK) – một nhóm tế bào miễn dịch cũng là các tế bào giết tiềm năng đối với các tế bào tăng sản ung thư. Các phân tử khác trong họ interleukin có hiệu ứng tương tự và cũng đã được nghiên cứu là interleukin 4 (IL-4), interleukin 7 (IL-7) và interleukin 12 (IL-12). IL-12 là một heterodimer gồm peptide 40.000 và 35.000. Đáp ứng qua trung gian tế bào Th1 thường cộng lực với các cytokine Th1 khác như IFN-g và IL-2. Một cytokine khác được quan tâm nhiều trong những năm gần đây là yếu tố kích thích bạch cầu hạt đơn nhân (granulocyte-monocyte stimulating factor- GMCSF). Cytokine này thúc đẩy sự hoạt hóa APC và vì vậy hy vọng có thể mở rộng trực tiếp tới CTL thông qua

sự tương tác APC/CTL. Cuối cùng, mặc dầu việc cải biến trực tiếp các vaccine tế bào khối u để biểu hiện cytokine đã được khích lệ với các kết quả tiền lâm sàng và lâm sàng, nhưng rõ ràng là việc sử dụng nó một cách rộng rãi thì vẫn còn nhiều trở ngại vì có những thay đổi trong biểu hiện cytokine cần quan tâm. Tuy vậy, các tế bào như nguyên bào sợi được công nghệ hóa có thể biểu hiện được các cytokine quan tâm. Sau đó, những tế bào này có thể được tiêm cùng với các tế bào hoang dã đã chiếu xạ hoặc những tế bào khối u được cải biến để thúc đẩy ĐUMD ở vị trí tiêm. Tương tự như vậy, việc theo dõi các tế bào tiết cytokine vào các lớp u như thế nào cũng có thể thực hiện được bằng cách tiêm hẳn vào khối u. Các thử nghiệm lâm sàng pha I với nguyên bào sợi tiết IL-2 đã được hoàn tất và có thể kết luận được rằng các tế bào này trong các chế phẩm vaccine có thể làm tăng ĐUMD đặc hiệu kháng u.

15.3.4.3 Sự kiểm chế miễn dịch

Khối u có phát triển được hay không là tùy thuộc vào khả năng tránh né hệ miễn dịch của nó. Chẳng hạn như kiểm chế miễn dịch thường thấy ở những bệnh nhân u não. Những công trình gần đây đã chứng minh rằng sự suy yếu của ĐUMD có thể liên quan trực tiếp với việc sản xuất trong các khối u ở sọ một hoặc nhiều cytokine kiểm chế miễn dịch rõ rệt. Một cytokine kiểm chế miễn dịch đặc hiệu là yếu tố tăng trưởng biến nạp β (transforming growth factor β -TGF- β). Hiện tại có 3 đồng dạng của TGF- β là TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. Ngoài ra còn có TGF- β trọng lượng phân tử lớn có thể là phân tử TGF- β 1 liên kết với một protein lớn hơn của tế bào. Tất cả các đồng dạng của TGF- β , trừ mẫu có trọng lượng phân tử cao thì đều được tiết ra ở dạng dimer và nó sẽ được phân cắt một phần bởi acid hoặc protease để trở nên có hoạt tính. Một trong số 3 đồng dạng của TGF- β là cytokine TGF- β 2 (trước kia gọi là yếu tố kiểm chế tế bào T từ u nguyên bào xốp) có ở huyết tương với mức cao ở dạng hoạt hóa sinh học trong các bệnh nhân kiểm chế miễn dịch với u tế bào hình sao tự ghép (anaplastic astrocytoma) hoặc đa u nguyên bào xốp (glioblastoma). Nguồn cung cấp các yếu tố này chính là các tế bào bướu não, vì đã quan sát thấy yếu tố này có nồng độ cao ở các dòng tế bào phát triển bướu não *in vitro*. Ngoài ra, còn chứng minh được rằng hàm lượng của một số TGF- β có giảm xuống và sự cạnh tranh miễn dịch được phục hồi với một mức độ nào đó khi cắt bỏ khối u, phát hiện này càng củng cố thêm rằng các tế bào khối u như là nguồn của TGF- β 2. TGF- β 1 cũng thấy có nhiều trong huyết tương của những bệnh nhân ung thư kết tràng và tỷ lệ tăng liên quan trực tiếp với bệnh theo phân loại Duke về các giai đoạn của khối u. Hơn nữa, từ mức cao TGF- β 1 này (11,9ng/ml) để tiến tới mức bình thường (3,8 ng/ml) phải mất 4 tuần hoặc lâu hơn nữa sau khi đã phẫu thuật cắt bỏ. Một cytokine kiểm chế miễn dịch tiềm tàng khác đã phát hiện được ở những bệnh nhân u tế bào hình sao tự ghép hoặc đa u nguyên bào xốp là interleukin 10 (IL-10). Hoạt tính kiểm chế miễn dịch của IL-10 hiện nay đã biết rõ. Vừa mới gần đây người ta đã chứng minh được rằng IL-10 ức chế sự tăng sinh tế bào T *in vitro* trong đáp ứng với các kháng nguyên hòa tan và làm giảm mạnh sự tăng sinh của các tế bào hoạt hóa lập thể (alloreactive) của người và các phản ứng của tế bào lympho pha trộn (mixed lymphocyte reaction - MLR). Ngoài ra, IL-10 còn cảm ứng trạng thái mất đáp ứng đặc hiệu kháng nguyên dài hạn trong các tế bào T CD4+ của người. Vì các lý do trên nên IL-10 có thể sẽ ngăn trở ĐUMD kháng u. Hiện nay có nhiều công trình chứng minh sự điều hòa xuống của TGF- β , nhờ kỹ thuật antisense có thể sẽ cho hiệu ứng gây miễn dịch rất cao cho các vaccine tế bào khối u. Các tế bào này có thể được công nghệ

hóa *ex vivo* và có thể sử dụng đơn hoặc kết hợp cùng các cytokine, chuyển vào các tế bào khối u hoặc các tế bào vận chuyển đồng phân phối các vaccine tế bào khối u. Những nghiên cứu hiện nay trên các bệnh nhân đa u não sẽ giúp ta hiểu được giá trị lâm sàng của chiến lược này. Nói tóm lại, sự cải biến miễn dịch kháng khối u thông qua GTL đã được nghiên cứu với nhiều chiến lược. Biến cải khối u *in vivo* để biểu hiện được các phân tử đồng kích thích và /hoặc các cytokine đã làm tăng phản ứng miễn dịch ở ngay tại khối u. Người ta đang nghiên cứu việc sử dụng các tế bào khối u khác loại hay đồng loại được cải biến *ex vivo* như các vaccine. Những phương pháp trị liệu này có thể được áp dụng sau khi đã được phẫu thuật để tiêu diệt các tế bào biến nạp vẫn còn tồn đọng do chưa được loại đi bằng vật lý. Cũng hy vọng rằng những vaccine này có thể làm giới hạn được sự phát triển di căn đối với các khối u sơ cấp. Trong những năm tới đây chắc chắn chúng ta sẽ có nhiều thông tin liên quan tới hiệu ứng lâm sàng của sự cải biến gen đối với đáp ứng kháng u.

15.4 Các vaccine kháng ung thư DNA

Sản xuất vaccine kháng ung thư là một khái niệm dựa trên 3 nguyên tắc sau đây: (1) giữa một tế bào bình thường và một tế bào ác tính có sự khác biệt về chất lượng và số lượng, (2) hệ miễn dịch có thể xác định được sự khác biệt giữa các dạng tế bào và (3) hệ miễn dịch có thể được chương trình hóa bằng tiêm chủng để nhận dạng được những khác biệt giữa các tế bào bình thường và tế bào ác tính. Tiên đề cơ bản của miễn dịch học là phải phân biệt rõ ràng giữa mình và không phải là mình (self and nonself) trên cơ sở của miễn dịch qua trung gian tế bào và sự biểu hiện của kháng nguyên MHC. Vaccine kháng ung thư cố gắng tập trung vào 5 lĩnh vực liên quan tới việc nâng cao tính miễn dịch của vật chủ thông qua việc nhận dạng và ghi nhớ các tế bào ác tính: (1) tiêm chủng các tế bào ác tính đã chiếu xạ, có hoặc không có chất bổ trợ (adjuvant) và được cải biến bằng thâm nhiễm với các cytokine hoặc các phân tử phụ trợ để nâng cao hơn ĐUMD; (2) tiêm chủng tế bào với các protein liên quan tới khối u để cho phép thực bào bởi các tế bào trình diện kháng nguyên và trình diện tới các tế bào giết thông qua các alen MHC; (3) tiêm chủng hoặc trình diện các kháng nguyên khối u polypeptide hoặc các thể đột biến như là quá trình môi kháng nguyên; (4) tiêm chủng với DNA trần hoặc các vec tơ virus có chứa các cDNA mã cho các kháng nguyên liên quan tới khối u, các phân tử phụ trợ, các cytokine hoặc các phân tử khác để làm tăng tính miễn dịch và (5) tiêm chủng các kháng nguyên carbohydrate liên quan với các tế bào ác tính. Những chiến lược vaccine này có thể là đích trực tiếp đối với ung thư hoặc thâm nhiễm virus có liên quan tới sự phát triển ung thư. Chẳng hạn như, sự thâm nhiễm mạn tính với virus viêm gan C có thể làm phát triển các khối u tế bào gan. Vì thế, việc sản xuất một vaccine để ngăn ngừa sự thâm nhiễm virus viêm gan C sẽ làm giảm nguy cơ ung thư gan.

15.4.1 Các vaccine cơ sở vec tơ

Cơ sở miễn dịch học của việc thâm chuyển tế bào với các cytokine hoặc các phân tử phụ trợ là tăng cường ĐUMD kháng khối u. Đích của tăng cường ĐUMD là nâng cao sự trình diện kháng nguyên. Một cách tiếp cận là công nghệ gen các tế bào khối u để trình diện trực tiếp các kháng nguyên khối u tới các tế bào T độc tế bào hay các tế bào T giúp đỡ. Vì thế, một tiểu quần thể tế bào ung thư sẽ được hướng vào các tế bào trình diện kháng

nguyên chuyên nghiệp như đại thực bào hoặc tế bào phân nhánh (dendritic). Nhiều cytokine và yếu tố tăng trưởng đã được thâm chuyển vào các tế bào khối u trên cơ sở giả thuyết cho rằng khi tăng biểu hiện cytokine ở vị trí u thì sẽ làm tăng sự trình diện kháng nguyên cục bộ và tính miễn dịch kháng u, đặc biệt là các tế bào T độc tế bào CD8+. Những yếu tố sơ cấp liên quan tới sự tránh né của các tế bào khối u khỏi sự “trông nom” của các tế bào T độc tế bào là làm mất sự biểu hiện của các phân tử đồng kích thích tới các tế bào khối u và một môi trường cytokine không thích hợp. Đối với các tế bào T độc tế bào, để giết một tế bào khối u nó đòi hỏi phải có 2 tín hiệu nội bào: (1) tín hiệu đặc hiệu kháng nguyên trung gian bởi sự gặp gỡ receptor tế bào T với phức hợp MHC và (2) phân tử không đặc hiệu kháng nguyên hoặc đồng kích thích sẽ được cung cấp bởi các receptor phụ trợ sau khi xảy ra ligand trên các tế bào trình diện kháng nguyên. Vì thế, sự có mặt của các phân tử đồng kích thích (receptor CD28 của tế bào T và họ B7 ligand trên các APC) là nhân tố cho sự mở rộng tế bào T và trạng thái ĐUMD. Các nghiên cứu trên động vật chỉ rõ rằng khi thâm chuyển các tế bào u hắc sắc tố với các phân tử đồng kích thích B7 đã thúc đẩy tính miễn dịch kháng khối u cũng như sự thâm chuyển với các cytokine và các yếu tố tăng cường như IL-2, IL-4, IL-6, interferon- γ và GM-CSF. Đối với sự thâm chuyển, ĐUMD quan sát thấy gồm sự thâm nhập ưa eosin với các tế bào T CD4+ và CD8+. Trong một hệ thống đặc biệt, các tế bào bệnh bạch cầu tuỷ cấp được thâm chuyển với một retrovirus có chứa một gen chuyển cho B7.1 và 10^4 đến 10^5 tế bào được phân phối vào chuột có mang khối u. Kết quả cho thấy tất cả chuột đều loại thải khối u của chúng và duy trì 6 tháng không có u. Tham gia đáp ứng miễn dịch loại thải gồm IL-2 và interferon- γ cũng như chính các tế bào T CD8+ hoạt hóa. Tuy nhiên, những nghiên cứu này cũng đã chỉ rõ rằng các vaccine DNA không có hiệu ứng trên động vật có khối u lớn. Ở những động vật này, hiệu ứng của vaccine có thể được nâng cao nếu được kết hợp với hóa trị liệu. Những thắng lợi pha I này đã mở cửa cho các thử nghiệm lâm sàng với việc sử dụng các cytokine tái tổ hợp và các phân tử đồng kích thích.

15.4.2 Tiêm chủng vaccine cơ sở tế bào

Có 2 cách tiếp cận GTL cơ sở tế bào đối với trị liệu miễn dịch ung thư là các vaccine khối u cải biến gen và tiêm chủng tế bào phân nhánh (dendritic). Cả 2 cách tiếp cận này đều đòi hỏi phải nhận dạng được tế bào của khối u và tăng cường ĐUMD. Như đã trình bày ở trên, các chiến lược vaccine đối với việc loại trừ khối u phải bắc cầu qua nhiều cách GTL trên cơ sở làm tăng ĐUMD.

15.4.2.1 Các vaccine khối u cải biến gen

Cơ sở gốc cho cách tiếp cận này là tăng cường tính miễn dịch của khối u thông qua sự biểu hiện của các cytokine đặc hiệu bổ sung. Các cytokine được giả định sẽ trợ giúp cho quá trình trình diện kháng nguyên và tạo ra tính miễn dịch kháng khối u. Giả thuyết này được xây dựng trên cơ sở các dữ liệu chứng minh rằng khi tiêm chủng với các tế bào khối u không được cải biến thì không làm tăng được tính miễn dịch kháng khối u. ĐUMD bảo vệ cảm ứng cytokine bao gồm các tế bào T giúp đỡ và các tế bào T độc tế bào trên cơ sở tiêm chủng. Các tế bào T sẽ được hợp nhất để phát triển các kháng thể đặc hiệu kháng u như các kháng thể idiotype và anti-idiotype, những kháng thể này sẽ thúc đẩy độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-

mediated cytotoxicity – ADCC). Các tế bào độc tế bào chín sẽ được tạo ra từ các tế bào còn non thông qua tiêm chủng. Mục đích của tiêm chủng tế bào khối u là cảm ứng thiết lập sự thoái lui của khối u hoặc thiết lập trí nhớ miễn dịch chưa đạt yêu cầu với sự chứng minh *in situ* mức cytokine có thể đạt tới mức “sinh lý học” nhờ sự thâm chuyển *ex vivo* các tế bào khối u đồng loại.

Các nghiên cứu đương thời chứng minh rằng cách hiệu quả nhất để tạo được các tế bào T chín là thông qua sự trình diện tế bào khối u. Các kháng nguyên khối u có thể được trình diện thông qua sự giải phóng các kháng nguyên liên quan tới tế bào khối u trên các tế bào chết hoặc apoptosis. Kháng nguyên giải phóng từ các tế bào khối u thông qua đáp ứng viêm sẽ dẫn đến sự thoái hóa kháng nguyên khối u và làm chết tế bào. Sự mỗi kháng nguyên kiểu này là con đường chính để cảm ứng các tế bào T độc tế bào. Vì thế, cách tiếp cận GTL làm tăng ĐUMD qua thâm chuyển gen cytokine là hiệu quả đối với sự hoạt hóa con đường mỗi kháng nguyên để cảm ứng các tế bào T độc tế bào. Như đã lưu ý trước, các nỗ lực thâm chuyển nhằm vào các gen IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, β -interferon, các yếu tố hoại tử khối u hoặc yếu tố kích thích quần thể đại thực bào – bạch cầu hạt. Những nỗ lực này cho thấy việc cảm ứng tính miễn dịch đặc hiệu khối u trên động vật là loại trừ các thách thức tiếp theo của khối u (ung thư phổi hoặc vú). Hơn nữa, sự nỗ lực thâm chuyển gen B7.1 chính là nhằm tăng cường trình diện kháng nguyên khối u. Đối với trường hợp các khối u rắn thông thường, phát triển đặc biệt chậm thì sự thâm chuyển cảm ứng virus không phải là tối ưu để chuyển giao các gen làm tăng cường miễn dịch. Đối với các khối u này, tỷ lệ thâm chuyển đạt được giữa khoảng 10 và 15% khi sử dụng vec tơ DNA plasmid có các đoạn lặp tận cùng dài của virus adeno liên hợp (AAV) hợp nhất vào một liposome. Việc tiêm chủng hàng tuần với các cấu trúc này trên mô hình động vật ung thư phổi di căn cho thấy có làm giảm di căn phổi. Mặc dầu những phương pháp này đã cho những kết quả khích lệ, nhưng sau chót phải là sử dụng các tế bào trình diện kháng nguyên trong các chiến lược tiêm chủng.

15.4.2.2 Tiêm chủng với các tế bào phân nhánh (dendritic)

Việc sử dụng các tế bào phân nhánh trong các chiến lược tiêm chủng để cảm ứng tính miễn dịch kháng khối u dựa trên cơ sở giả thuyết cho rằng nếu chỉ mỗi tế bào T độc tế bào thì sẽ thiếu hoặc không có hiệu ứng, do đó gây nên sự tăng sinh của khối u. Vì thế khi làm tăng sự biểu hiện kháng nguyên khối u bằng tế bào phân nhánh thì sẽ làm giới hạn sự cần thiết của việc chuyển kháng nguyên từ tế bào khối u tới tế bào trình diện kháng nguyên (KN). Trong trường hợp này, sự nhận dạng tế bào khối u bởi hệ miễn dịch bẩm sinh sẽ không cần thiết cho việc cảm ứng tính miễn dịch tế bào T kháng khối u. Quan điểm bao trùm của sự tiêm chủng tế bào phân nhánh là sử dụng kỹ thuật chuyển gen *ex vivo* để biểu hiện quá mức các KN tế bào khối u trên bề mặt tế bào trình diện KN và sau này vaccine hóa để cảm ứng tính miễn dịch kháng u. Cách tiếp cận này đòi hỏi những kỹ thuật tối ưu và phải qua nhiều bước. Vấn đề này bao gồm việc phân biệt và xác định các đặc trưng của gen miễn dịch khối u (KN cảm ứng ĐUMD), phân lập và phát triển *in vitro* các tế bào phân nhánh, các kỹ thuật chuyển gen hoặc protein đối với các tế bào phân nhánh, xác định các phương pháp tiêm chủng và khảo sát các hiệu ứng ngược liên quan tới việc tiêm chủng kể cả sự cảm ứng tính miễn dịch. Cách tiếp cận của việc tiêm chủng tế bào phân nhánh là sử dụng các mô hình động vật về ung thư của người. Điều đáng lưu ý nhất là việc làm test trong mô hình di căn sau phẫu thuật trên chuột nhằm tránh sự tăng trưởng

của các di căn nhỏ tồn tại từ trước, sau khi được cắt bỏ khối u sơ cấp. Trong mô hình này, việc điều trị cho chuột mang khối u với các tế bào phân nhánh biểu hiện các KN từ khối u hoặc dạng chiết xuất protein tế bào khối u hoặc các peptide khối u đặc hiệu hay RNA đều dẫn đến kết quả làm cảm ứng tính miễn dịch đặc hiệu khối u.

Người ta đã chứng minh được hiệu quả của tiêm chủng tế bào phân nhánh trong mô hình ung thư của người trên động vật. Những nghiên cứu gần đây đã khảo sát sự địa phương hóa của các tế bào phân nhánh có đánh dấu phóng xạ ở người dựa trên cơ sở đường hấp thu của nó. Các tế bào phân nhánh được phân phối qua tĩnh mạch, khởi đầu định vị ở phổi rồi tới gan, lách và tủy xương. Những tế bào được phân phối trong da sẽ bị ra khỏi vị trí tiêm và di cư tới các hạch bạch huyết vùng. Vì thế, việc phát triển tính miễn dịch kháng khối u ở người nhờ tiêm chủng tế bào phân nhánh sẽ phụ thuộc vào dạng khối u và đường phân phối của vaccine.

15.4.3 Các vaccine cơ sở idiotypic

Thuật ngữ *idiotypic* biểu thị một dãy các quyết định kháng nguyên (QĐKN) có thể xác định bằng huyết thanh học trên phân tử kháng thể đã cho. Khi các QĐKN này chia sẻ với các kháng thể, các yếu tố hòa tan hoặc các tế bào thì gọi là *idiotypic* phản ứng chéo (*cross-reactive idiotypic* –CRI). Các CRI tạo cơ sở cho mạng lưới điều hòa miễn dịch và thông tin giữa các thành viên của mạng lưới. CRI có thể chiếm một tỷ lệ lớn trong quần thể kháng thể đã cho. Các CRI_M còn được chỉ định là idiotypic điều hòa trội. Theo hệ quả, khi một phần nhỏ kháng thể biểu hiện một CRI thì được định nghĩa là một idiotypic phản ứng chéo thứ yếu (minor cross-reactive idiotypic –CRI_m). Từ sự biểu hiện một cách tương đối idiotypic có thể suy ra được mức độ kết nối giữa các thành viên của hệ miễn dịch (kháng thể, các yếu tố, các tế bào B và T). Đó cũng là cơ sở cho khía cạnh điều hòa miễn dịch của mạng lưới miễn dịch idiotypic. Khía cạnh miễn dịch kiểu gen idiotypic (idiotypic) nguyên gốc được đề cử như là một nhóm tương tác hỗ trợ tạo cơ sở cho sự tự điều hòa của ĐUMD đồng loại (Bảng 15.9). Cơ sở đi tới giả thuyết này là do tính chất hai mặt của một phân tử kháng thể. Phân tử kháng thể sơ cấp có thể nhận dạng và gắn với KN thông qua vị trí gắn KN. Cũng ở vị trí này là sự biểu hiện kiểu gen idiotypic. Vì thế khi tác động với tư cách là kháng nguyên, các phân tử idiotypic (Ab1) cảm ứng một quần thể thứ hai của các phân tử kháng thể (Ab2). Các phân tử kháng thể này bổ cứu huyết thanh học với các phân tử kháng thể Ab1. Các quần thể kháng thể Ab2 được gọi là kháng idiotypic (anti-idiotypic). Một tiểu quần thể độc quyền của các kháng thể kháng idiotypic là các thành viên được xác định huyết thanh học bởi các KN khởi đầu. Tiểu quần thể này không bổ cứu với vị trí gắn KN của quần thể Ab1 và khi gắn vào các kháng thể idiotypic thì bị ức chế bởi KN. Khi xét tới các hình ảnh bên trong của KN thì các KN đặc hiệu khối u trong trường hợp này sẽ đại diện cho các ứng cử viên là các phân tử vaccine trong trị liệu miễn dịch ung thư.

Bảng 15.9 Các khía cạnh huyết thanh học của các Ig và các tế bào B và T

Idiotypic	Anti-Idiotypic	Ant-anti-Idiotypic
Ab1	Ab2	Ab3
Gắn kháng nguyên	Gắn idiotypic	Gắn kháng nguyên
Cảm ứng bởi KN idiotypic	Cảm ứng bởi idiotypic	Cảm ứng bởi anti-idiotypic

Biểu hiện CRI khác	Xác định CRI	Biểu hiện CRI và idiotypic (mở rộng repertoire)
Các phân tử cá thể	Các tiểu quần thể có thể là hình ảnh bên trong của kháng nguyên	Các phân tử cá thể có thể trung hòa các tế bào ung thư; về cơ bản một quần thể có thể có hiệu ứng cao hơn Ab1 (mở rộng repertoire)

Các idiotypic được biểu hiện bởi các tế bào khối u trong các u ác tính tế bào B có thể xem như các KN đặc hiệu khối u và là các đích cho trị liệu miễn dịch bằng vaccine. Các hapten, các chất phụ trợ và các cytokine đã được dùng để làm tăng tính miễn dịch idiotypic và thiết lập một ĐUMD bảo vệ kháng idiotypic. Những kết quả này đã được mở rộng nhờ sử dụng kỹ thuật DNA để phát triển các protein nấu chảy (fusion) và các vaccine DNA trần bao gồm các thành phần của mạng lưới idiotypic - kháng idiotypic. Vì thế, việc tiêm chủng idiotypic đã thể hiện hiệu ứng trong các cá thể u bạch huyết tế bào B và đa u tủy. Trong những bệnh nhân này thời kỳ không bệnh cũng như sự sống sót được kéo dài và tạo được tính miễn dịch đặc hiệu idiotypic. Những nghiên cứu khởi đầu trên động vật chứng minh rằng có tồn tại mạng lưới idiotypic - kháng idiotypic. Mạng lưới này gồm KN đặc hiệu khối u, Ab1 (idiotypic), kháng thể kháng idiotypic Ab2 và kháng thể kháng - kháng idiotypic (anti-anti idiotypic antibody). Đối với việc tiêm chủng idiotypic người ta sử dụng những vùng biến đổi cao của các chuỗi nặng và nhẹ của Ig có chứa các idiotypic. Các QĐKN này có thể được miễn dịch trực tiếp hoặc có thể tạo nên ĐUMD kháng u nhờ các polypeptide nhỏ tổng hợp cộng hợp với một chất mang sinh miễn dịch. Cả kháng thể kháng u và các tế bào T CD4+ (giúp đỡ) và CD8+ (độc tế bào) được tạo ra đều có thể nhận diện một cách đặc hiệu idiotypic KN đặc hiệu khối u gốc (chất sinh miễn dịch-immunogen). Việc tiêm chủng với các yếu tố tăng trưởng như yếu tố kích thích quần thể đại thực bào - bạch cầu hạt nâng cao ĐUMD kháng u phải lưu tâm đặc biệt tới các tế bào diệt khối u (CD8+). Ngoài ra, khi các động vật được gây miễn dịch với các kháng thể kháng idiotypic (Ab2) thì cũng hình thành các đáp ứng kháng thể đối với KN đặc hiệu khối u, kháng thể kháng - kháng idiotypic (Ab3). Đáp ứng kháng thể này khuếch đại sự đa dạng gắn KN cao hơn các kháng thể Ab1 đồng thời làm giảm chức năng tăng trưởng và sự quần thể hóa khối u *in vivo*. Khi tiêm chủng với các cấu trúc DNA mã cho idiotypic u bạch huyết sẽ dẫn đến đáp ứng kháng thể kháng idiotypic đặc hiệu. Các kháng thể Ab2 này sẽ bảo vệ động vật khỏi thách thức với u. Tiêm chủng trong da các cấu trúc DNA có thể có dạng DNA trần mã cho vùng biến đổi của kháng thể người. Trong một thử nghiệm lâm sàng dài hạn, người ta đã kiểm chế được khối u ở các bệnh nhân ung thư. Vì thế, việc tiêm chủng idiotypic phải được áp dụng trong những trường hợp đa u tủy và u bạch huyết. Đây là một phương pháp cảm ứng tính miễn dịch khối u để phòng ngừa các bệnh hay tái phát.

15.5 Tóm lại

Có nhiều phương pháp trị liệu gen đối với ung thư trong lâm sàng trên cơ sở làm tăng tính miễn dịch kháng u của vật chủ hoặc tăng độ nhạy cảm đối với thuốc kháng u. Quy trình bao gồm các kỹ thuật trị liệu gen *ex vivo* và *in vivo* với sự chuyển gen của các cytokine hoặc phân tử bổ trợ, hoặc chuyển gen gây độc tế bào cảm ứng tiền thuốc, hoặc

tiêm chủng gen và sự hiệu chỉnh phân tử những biến đổi gen đối với sự gây ung thư. Vấn đề thứ hai này bao gồm việc làm bất hoạt biểu hiện gen ung thư cũng như thay thế các gen kiểm chế khối u bị khiếm khuyết. Cho tới nay, những số liệu thu được cho thấy với các bệnh nhân ung thư tiến triển thường vẫn được điều trị theo các phương pháp truyền thống, còn việc trị liệu gen có thể làm trung gian kiểm chế khối u, nhưng độc tính phải thấp và các tác dụng phụ ở mức có thể chấp nhận được. Các vec tơ virus cũng cần phải được cải biến để giảm độc tính và tính sinh miễn dịch, đồng thời phải nâng cao hiệu ứng tải nạp cả với các vec tơ virus và không virus. Cần phải nâng cao hơn nữa về đích cũng như tính đặc hiệu khối u, đồng thời phải hiểu sâu hơn nữa về sự điều hòa gen, sự chết theo chương trình của tế bào (apoptosis), đồng thời phải phối hợp giữa GTL và hóa trị liệu để nâng cao hơn nữa chất lượng điều trị bệnh ung thư.

Chương XVI

ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH GAN

16.1 Mở đầu

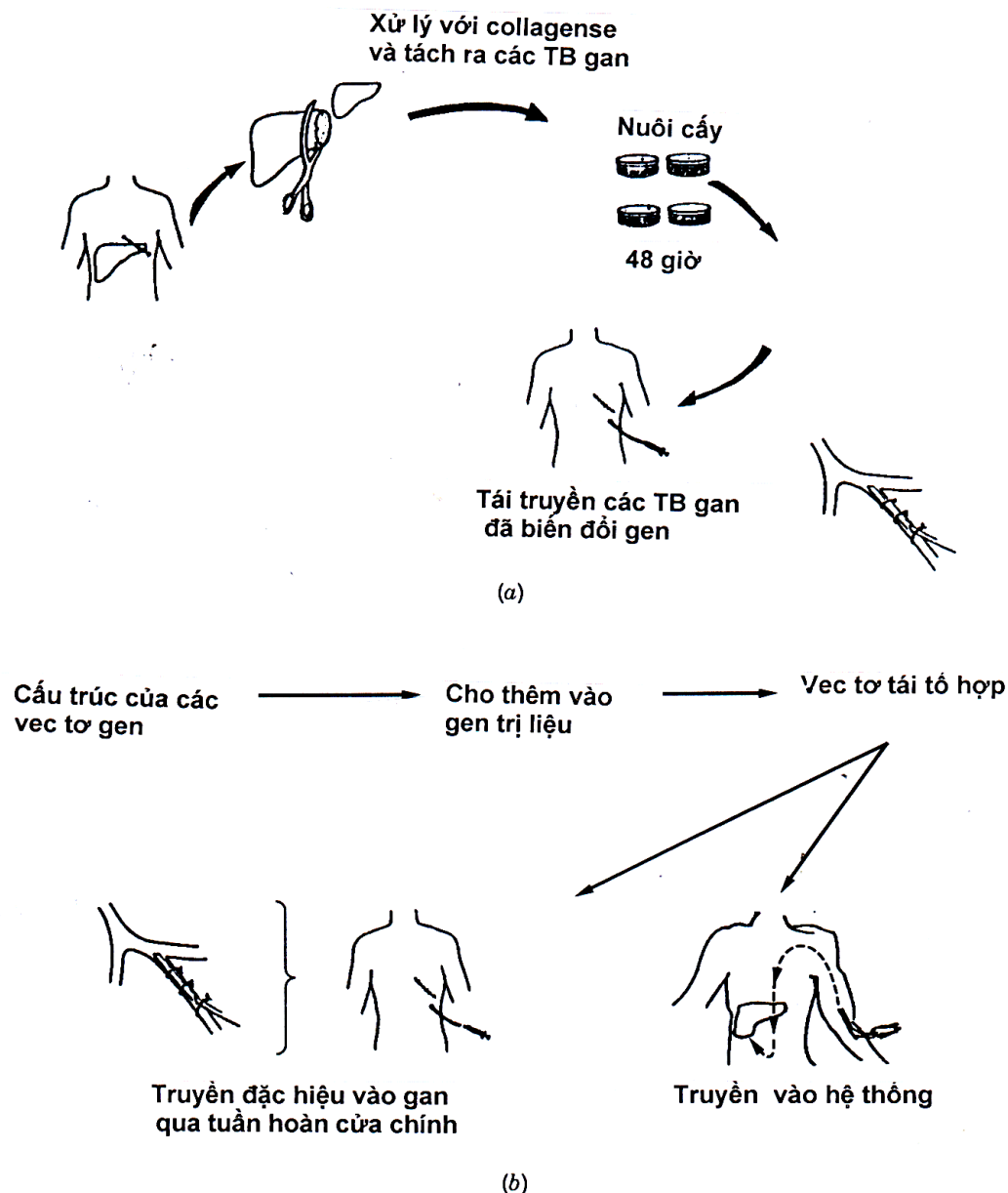
Gan là một tổ chức phức tạp cả về giải phẫu và chức năng. Những thách thức hiện nay đòi hỏi cần có sự can thiệp của GTL đối với các bệnh gan. Về giải phẫu học, gan là một tổ chức lớn, nhiều thùy, hình chữ V. Ở người trưởng thành, trung bình gan chiếm 1,8 – 3,1% trọng lượng toàn bộ cơ thể. Ở trẻ em, tỷ lệ này thậm chí còn cao hơn, chiếm tới 5,6% trọng lượng cơ thể khi sinh. Gan nhận máu từ tĩnh mạch cửa chính cũng như từ động mạch gan, vì thế nó là những “bến cảng” cho các cách trị liệu. Tĩnh mạch cửa là mạch dinh dưỡng chứa máu từ tất cả các hệ mao quản của đường tiêu hóa, lách, tụy và túi mật. Động mạch gan cung cấp một lượng thích ứng máu bão hòa oxy cho gan. Khi xơ cứng tĩnh mạch cửa chính và động mạch gan sẽ làm thay đổi sự chuyển hóa và các chức năng động lực máu của gan. Đơn vị chức năng của gan là các tuyến nang (acinus) - một khối nhu mô nhỏ bao gồm một tiểu động mạch, tiểu tĩnh mạch cửa chính, tiểu quản mật và ống bạch huyết. Thực tế có mối quan hệ khu vực giữa các tế bào của tuyến nang và sự cung cấp máu của chúng. Các chức năng chuyển hóa khác nhau xảy ra trên các tế bào của mỗi vùng. Chẳng hạn như, sự tổng hợp mới đường xảy ra ở các tế bào thuộc vùng 1, vùng trước tiên được cung cấp máu tươi bão hòa oxy. Các tế bào vùng 3 chuyển hóa tích cực alcohol và các biến đổi sinh học hoặc giải độc thuốc. Vì thế, các vùng khác nhau của mô gan là đích trị liệu của mất chức năng chuyển hóa. Theo những phát hiện gần đây thì các tế bào gốc của gan và các dòng tế bào khác cũng liên quan rất nhiều tới GTL gan. Những phát hiện này chỉ rõ rằng các đặc trưng tế bào, kiểu hình, chức năng và sự chuyển hóa là sự độc quyền tới mức tế bào ở gan cũng như trên các vị trí ở từng khu vực. Vì thế gan biểu lộ cả sự không đồng nhất rất nhỏ cũng như tính phức tạp ở các mức độ khác nhau và hiện đang là các thách thức đối với việc ứng dụng GTL đối với tổ chức này. Những năm trước đây, đối với GTL thì gan không được quan tâm như một tổ chức đích. Trái ngược với tủy xương và các tế bào máu ngoại biên, các tế bào gan không dễ gì có thể tiếp cận được; hơn nữa, vẫn chưa có được nhóm tế bào gốc tách biệt rõ ràng của gan. Tuy nhiên, gần đây hơn với các đặc trưng của gan đã làm cho nhiều nhà nghiên cứu hướng tới việc ứng dụng GTL với gan. Gan có khả năng tổng hợp một lượng lớn các protein khác nhau và thực hiện nhiều cải biến sau phiên dịch để các protein này có các chức năng đặc biệt. Gan cũng có khả năng tái tạo sau những tổn thương bộ phận. Nhiều bệnh di truyền hệ thống như bệnh ưa chảy máu, bệnh tăng cholesterol huyết có tính chất gia đình, bệnh acid phenylpyruvic niệu và các bệnh do chuyển hóa khác có thể được điều trị bằng cách nhắm vào các khiếm khuyết di truyền nổi bật trong các tế bào gan. Ngoài ra, theo lý thuyết thì các chiến lược GTL có thể dùng để điều trị các bệnh mắc phải như sự thâm nhiễm virus của gan. Thâm nhiễm các virus viêm gan B và C là các vấn đề lớn của y tế cộng đồng toàn cầu. Vì những lý do này nên gan trở thành một tổ chức đích quan

trọng đối với GTL. Đồng thời, trong một số trường hợp xác định gan lại có những thách thức đặc biệt đối với GTL vì gan thường tăng sinh, tức là luôn có các tế bào đang phân chia và vì thế nó không phải là đích lý tưởng cho các vec tơ gen. Hơn nữa, bên cạnh các tế bào gan còn có cả các dạng tế bào khác nữa. Thực tế này cần phải được xem xét khi lựa chọn các loại vectơ và các kỹ thuật khác nhau để chuyển gen tới gan. Vì vậy, chúng ta sẽ lần lượt thảo luận về các phương tiện cơ sở hướng vào việc ứng dụng chúng cho sự chuyển gen tới gan, sau đó sẽ đề cập tới các ứng dụng lâm sàng cho tới tận thời điểm này.

16.2 Nguyên lý chung của GTL với gan

Có hai cách tiếp cận cơ bản đối với việc chuyển gen vào các tế bào gan: *ex vivo* và *in vivo* (Hình 16.1). Trị liệu *ex vivo* thì phải cắt bỏ một phần gan, để thu được các tế bào gan thì phần gan được cắt bỏ sẽ được xử lý với collagenase, đồng thời phải tách riêng tế bào gan khỏi các loại tế bào nhu mô bằng ly tâm gradient. Sau đó các tế bào này được nuôi cấy để phục vụ cho việc chuyển gen bằng một trong số các phương pháp sau đây: chọn lọc các quần thể tế bào để có thể công nghệ hóa và lại được truyền lại qua tĩnh mạch cửa chính cho bệnh nhân. Tuy nhiên, vấn đề này rất phức tạp bởi vì với vài chu kỳ phân chia thì việc mở rộng quần thể thật sự là không đáng kể. Hơn nữa, các tế bào gan sơ cấp khi nuôi cấy cũng bị giới hạn do một số không được biệt hóa. Một yếu tố nữa là, với một bệnh nhân ốm yếu thì khó mà đi hết được các thủ tục để có thể thu hái tế bào.

Khi các tế bào gan được giữ để nuôi cấy thì một vài phương pháp có thể được sử dụng để đưa các gen mới vào. Chẳng hạn như kỹ thuật qua trung gian DNA thì dựa vào các phương pháp thâm chuyển thông thường như đồng kết tủa calcium phosphate và diethylaminoethyl (DEAE) dextran với DNA, phức hợp với DNA thông qua tích tĩnh điện. Những hệ thống này do phức hợp nên được tế bào hấp thu bởi sự tiêu hóa nội bào (endocytosis). Electroporation là một kỹ thuật khác của thâm chuyển tế bào. Quá trình này liên quan tới khả năng hoàn trả tính thấm tức thời của màng sinh chất khi bị tác động bởi một xung điện. Khi thực hiện với sự có mặt của DNA thì màng sẽ cho phép acid nucleic đi vào tế bào. Cả 3 phương pháp này đều cho hiệu ứng thâm chuyển thấp và chỉ biểu hiện tức thời các gen trị liệu. Cuối cùng, các vec tơ virus khác cũng như các liposome có thể được sử dụng trong chuyển gen *ex vivo*. Đối với GTL *in vivo*, gen trị liệu hay gen bình thường sẽ được đưa trực tiếp vào vật chủ. Đối với GTL *in vitro*, cũng phải khắc phục trình trạng ghép lại nhiều lần và phải nuôi cấy tế bào gan sơ cấp. Mặt khác, điều cần thiết với bất cứ phương tiện vận chuyển nào trong GTL *in vivo* cũng phải chuyển được gen tới gan một cách hiệu quả. Việc áp dụng hệ thống vec tơ gen là đích lý tưởng với gan vì nó tránh được sự phân phối sinh học lan rộng cũng như tránh được các hiệu ứng bên ngoài gan. Khi vào tới gan, một gen chuyển phải vượt qua các tế bào nội mô để tới các tế bào nhu mô, đồng thời phải tránh được sự “làm sạch” với sự thực bào của các tế bào Kuffer. Trong GTL *in vivo* cũng có thể thực hiện một cách cơ học trực tiếp bằng cách tiêm các cấu trúc gen ngoại lai qua tĩnh mạch cửa chính để tới gan. Hiện nay một số hệ thống virus cũng như các chế phẩm liposome và cộng hợp protein- DNA đã được sử dụng trong GTL *in vivo* (Bảng 16.1)



Hình 16.1 Hai phương pháp cơ bản để chuyển gen tới gan. (a) *ex vivo*, đòi hỏi phải cắt một phần gan, thường là đoạn ở phía bên trái. Các tế bào gan này được xử lý với collagenase và các tế bào gan được tách khỏi các tế bào không phải nhu mô bằng ly tâm gradient. Các tế bào gan sau đó được nhân lên trong nuôi cấy để phục vụ cho việc chuyển gen. Cuối cùng, các tế bào biến nạp thành công sẽ được chọn lọc và truyền trở lại qua ống thông vào tuần hoàn cửa chính gan bệnh nhân. (b) *in vivo*, thiết lập một vec tơ gen thích hợp cho việc chuyển các gen tới gan. Gen trị liệu được hợp nhất vào trong vec tơ và vec tơ tái tổ hợp này được truyền vào bệnh nhân. Việc truyền hệ thống qua tĩnh mạch ngoại biên là thích hợp cho các vec tơ mà gan là đích lựa chọn; truyền trực tiếp vào tuần hoàn cửa chính là thích hợp đối với các vec tơ mà không cần quan tâm tới khả năng đích của gan.

(Theo Christy L. Schilling, Martin J. Schuster và George Wu. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Bảng 16.1 Những thuận lợi và trở ngại của các phương tiện vận chuyển liên quan tới GTL trực tiếp gan

Phương tiện vận chuyển	Thuận lợi	Trở ngại
Retrovirus	Không đáp ứng viêm/miễn dịch Không hoại tử gan Hợp nhất với sự biểu hiện ổn định	Đòi hỏi sự phân chia tế bào Biểu hiện thấp trong các tế bào gan <i>in vivo</i>
Adenovirus	Đích đặc hiệu với các tế bào gan Biểu hiện trong các tế bào không phân chia Đáp ứng miễn dịch/viêm Tổn thương tế bào gan	Vẫn còn là episome Biểu hiện tức thời
Virus adeno liên hợp	Biểu hiện trong các tế bào không phân chia Hợp nhất với sự biểu hiện ổn định Không đáp ứng miễn dịch/viêm	Khả năng chuyển giao nhỏ
Liposome	DNA được bảo vệ khỏi sự thoái hóa Khả năng chuyển giao lớn Không đáp ứng miễn dịch/viêm	Hấp thu bởi các tế bào không nhu mô của gan Thoái hóa nội bào trong lysosome
Protein/chất mang DNA	Đặc hiệu gan Khả năng chuyển giao lớn Không đáp ứng miễn dịch/viêm	Thoái hóa nội bào trong lysosome Vẫn còn episome Biểu hiện tức thì

16.3 Các vec tơ virus

16.3.1 Retrovirus

Retrovirus có thể thâm nhiễm được nhiều dạng tế bào khác nhau của động vật có vú kể cả các tế bào gan. Một giới hạn của việc sử dụng retrovirus nguyên mẫu trong GTL gan là nó chỉ thâm nhiễm được các tế bào đang phân chia. Để đánh lừa chúng, các nhà nghiên cứu đã thực hiện việc cắt bỏ một phần gan trước khi xử lý với retrovirus. Vì vẫn còn mô gan nên nó được cảm ứng tăng sinh trong đáp ứng với tổn thương này và ví thể mà tỷ lệ % tế bào tải nạp sẽ tăng lên.

16.3.2 Adenovirus

Từ lâu, những cấu trúc adenovirus chẳng những biểu hiện gen ngoại lai mà còn biểu hiện cả một số gen virus, vì vậy dẫn đến ĐUMD đặc hiệu virus biểu lộ bằng phát triển viêm gan và hủy hoại các tế bào gan đã biến đổi di truyền. Sự biểu hiện protein trị liệu thường không thể phát hiện được sau 4 tuần. Sự hình thành các kháng thể trung hòa bởi các lympho B kháng lại các protein virus làm cho việc sử dụng lặp lại các virus sẽ kém hiệu quả hơn. Vấn đề này được ngăn chặn nhờ loại bớt các gen virus phụ để giảm thiểu tối đa biểu hiện các protein virus. Người ta cũng thấy rằng mức độ biểu hiện gen tăng lên trong gan chuột khi ĐUMD trước đó đã giảm xuống. Các cấu trúc adenovirus mới hiện nay đều đã loại hết các gen virus. Một cách tiếp cận khác là xử lý tức thời với thuốc kiểm chế miễn dịch, kết quả là biểu hiện dài hạn hệ vec tơ adenovirus. Người ta cũng thấy rằng có khả năng hoàn trả dung nạp miễn dịch của chuột đối với KN adenovirus bằng cách tiêm vào hãn tuyến ức và cho uống dịch chiết protein adenovirus hoặc đưa virus vào tử cung (utero) sơ sinh do đó mà làm tăng sự biểu hiện dài hạn và cho phép tái phân phối các vec tơ adenovirus.

16.3.3 Virus adeno liên hợp

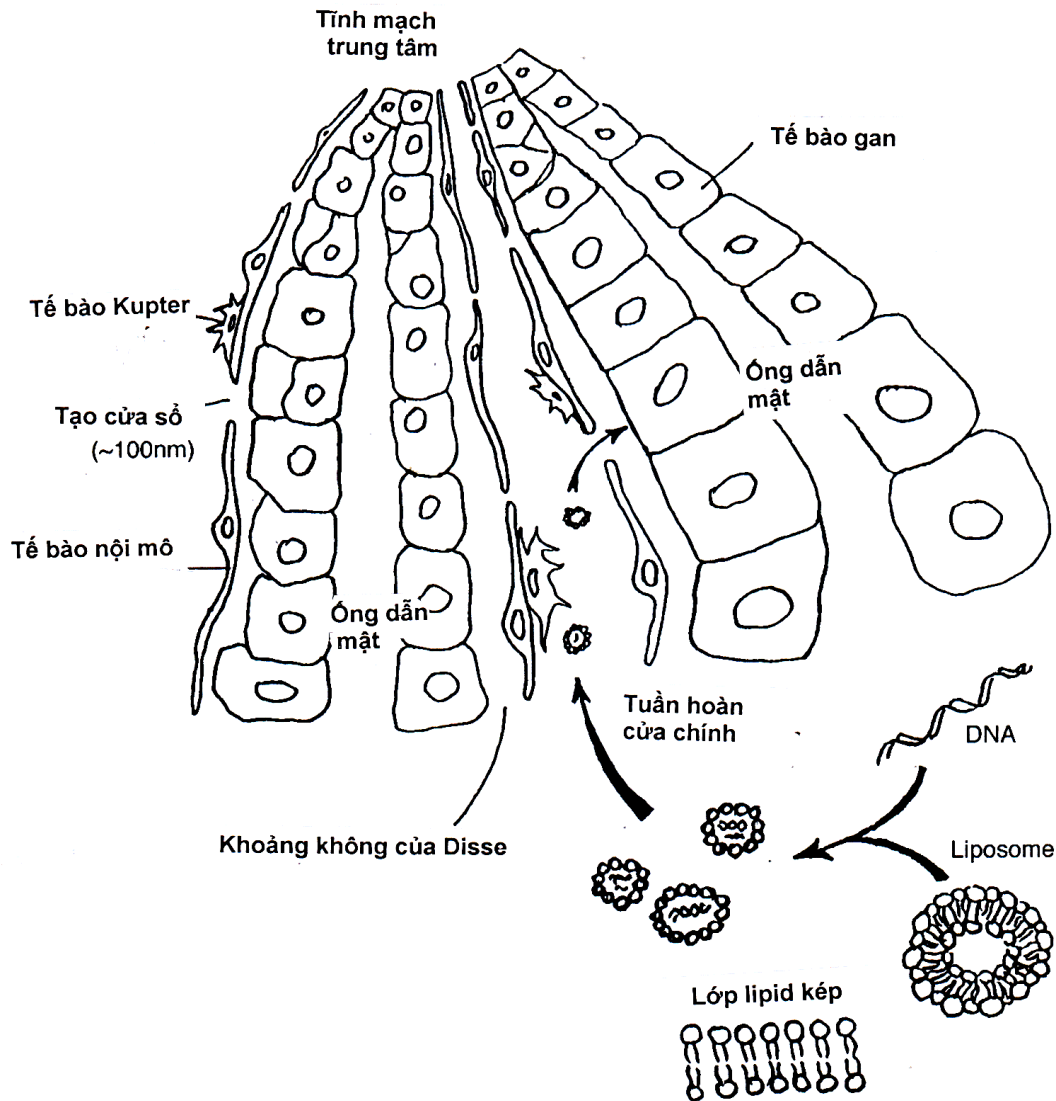
Virus adeno liên hợp (AAV) có thể thâm nhiễm được các tế bào đang phân chia cũng như không phân chia để tạo nên một vec tơ có thể sử dụng cho các tế bào như gan. Tuy nhiên, tỷ lệ tải nạp trong các tế bào không phân chia thì thấp hơn các tế bào đang phân chia. AAV tải nạp các tế bào ở pha S của chu kỳ tế bào. Những chất xử lý can thiệp vào sự chuyển hóa DNA như hydroxyurea hoặc aphidicolin và các chất ức chế topoisomerase sẽ làm tăng đáng kể hiệu ứng của hệ thống này. Sau chiếu xạ cục bộ vào gan, sự tải nạp tế bào gan tăng 900 lần so với các tế bào gan chuột không chiếu xạ. Điều này có thể dẫn đến một thực tế là chiếu xạ cũng gây độc tế bào và vì thế mà kích thích sự phân chia của các tế bào sống sót.

16.3.4 Các vec tơ không virus

16.3.4.1 Liposome

Liposome là các bong (túi) rất nhỏ có một hoặc nhiều ngăn chứa nước. Sự “làm sạch” liposome khỏi tuần hoàn bởi gan phụ thuộc vào kích cỡ và các thành phần trên bề mặt của liposome. Vì thủ thuật trở cửa sổ của các tế bào nội mô ở gan chỉ giới hạn ở đường kính khoảng 100nm còn những hạt lớn hơn 259 nm thì không qua được khoảng không của Disse vì thế mà sự tương tác với các tế bào gan là không đáng kể (Hình 16.2). Vì lý do này nên các liposome lớn hơn 100 nm sẽ được làm sạch bởi sự thực bào của các tế bào Kuffer và các tế bào nội mô. Khi thay đổi kích thước và các thành phần lipid của khối cầu này thì có thể làm thay đổi sự phân phối sinh học của các quần thể tế bào khác nhau trong gan. Vì thế liposome là đích của các tế bào gan và tế bào Kuffer. Một lợi thế của các liposome là các DNA có thể hợp nhất đơn giản vào pha nước hoặc gắn với các chất liệu lipid. Hơn nữa, gen cũng đã được đóng gói kỹ càng nên tránh được sự phân giải bởi các enzyme.

Các liposome cationic được sử dụng ở dạng phức hợp với DNA, trong đó DNA vẫn là sơ cấp ở phía ngoài của vi khối cầu. Đó chính là lợi thế bởi vì sẽ giới hạn được số DNA bị bẫy trong bong bóng và có thể tạo nên sự tập hợp của một hoặc nhiều liposome để ngăn chặn sự hấp thu hoặc thúc đẩy sự thực bào bởi các tế bào Kuffer. Liposome được các tế bào chiếm lĩnh thông qua sự tiêu hóa nội bào “endocytosis” và dần dần đi vào các lysosome. Trong lysosome xảy ra sự phân giải enzyme của các tế bào và



Hình 16.2 Các liposome được sử dụng như một phương tiện chuyển gen tới các tế bào gan. Liposome là các phương tiện vận tải có lớp lipid kép bao quanh bởi một hoặc nhiều thành phần chứa nước. DNA được hợp nhất trong pha nước hoặc liên kết với các chất liệu lipid sau khi trộn đơn giản với các thành phần lipid. Các liposome vào gan qua tuần hoàn cửa chính. Sự “làm sạch” chúng khỏi tuần hoàn phụ thuộc rất nhiều vào kích cỡ và các thành phần trên bề mặt của chúng. Vì thủ thuật trở cửa sổ của các tế bào nội mô ở gan chỉ có đường kính khoảng 100 nm nên các hạt lớn hơn 250 nm không thể qua được khoảng không của Disse. Chỉ các liposome nhỏ mới có thể trốn khỏi các tế bào Kuffer và các tế bào nội mô và tương tác với các tế bào nhu mô gan.

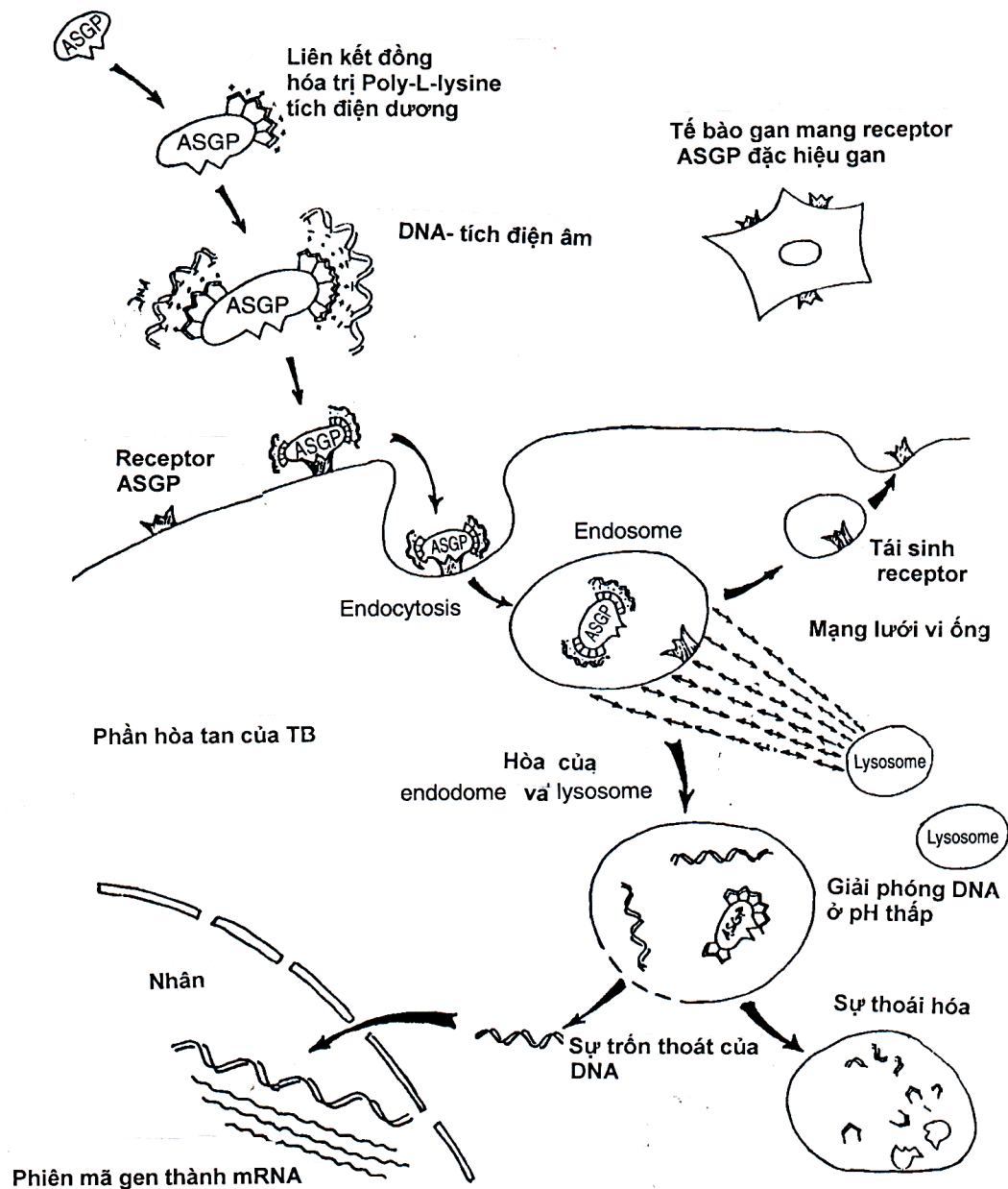
có thể làm giảm hiệu ứng chuyển gen trị liệu tới nhân. Để khắc phục vấn đề này các liposome được phát triển theo hướng nhạy cảm với pH để tránh sự hòa vào các lysosome. Sau khi “hòa nhập”, các liposome sẽ thay đổi các đặc tính ở endosome pH thấp. Trong khi tiêu hóa nội bào chúng có thể làm mất sự ổn định màng nội bào (endosomal) hoặc trở nên dung hợp. Theo phương thức này liposome có khả năng chuyển được các thành phần vào trong tế bào chất trước khi liposome được chuyển tới lysosome.

Cũng có nhiều cách khác nữa nhằm nâng cao hiệu ứng của các liposome đối với các tế bào nhu mô gan đích như hợp nhất các ligand khác nhau được nhận dạng bởi các receptor trên bề mặt các tế bào gan. Chẳng hạn như sự hợp nhất của các bán phần đích là yếu tố tăng trưởng biểu bì, lactosylceramide, asialofetuin, các ester của acid béo đơn với lactose và β -galactosidase. Đối với nhiều chế phẩm, sự hấp thu bởi các tế bào nội mô hoặc Kuffer trội hơn các tế bào nhu mô và người ta chưa thể định lượng được sự hấp thu của các dạng tế bào khác nhau ở gan. Các liposome có các gốc galactose cũng được nhận dạng bởi các tế bào Kuffer thông qua receptor hạt galactose và sự phân phối của chúng giữa các tế bào nhu mô và không nhu mô phụ thuộc rất nhiều vào kích cỡ. Các liposome rất nhỏ với khả năng tải nạp giới hạn hoặc các phương tiện vận chuyển có chứa lactosylceramide hoặc các ester của acid béo đơn với lactose là rất phù hợp với các tế bào nhu mô.

16.3.4.2 Các phức hợp protein – DNA

Các cộng hợp hòa tan xảy ra một cách tự nhiên giữa protein và DNA tái tổ hợp là công cụ hấp dẫn với GTL trực tiếp tới gan. Một ví dụ về việc sử dụng phức hợp protein – DNA để chuyển tới đích là dùng các receptor của asialoglycoprotein. Receptor asialoglycoprotein chỉ có nhiều trên màng sinh chất của các tế bào gan và nó gắn với các glycoprotein có galactose tận cùng và neoglycoprotein với ái lực cao. Các ligand chắc chắn được hòa nhập bởi các tế bào gan thông qua tiêu hóa nội bào trung gian receptor. Do tính đặc hiệu của nó nên các receptor asialoglycoprotein (ASGPr) được khai thác như một phương tiện để chuyển giao thuốc và DNA cho mục đích trị liệu cũng như các tác nhân chẩn đoán các tế bào gan.

Một hệ thống với cơ sở cộng hợp asialoglycoprotein-poly-L-lysine đã được phát triển để chuyển DNA tới gan thông qua ASGPr (Hình 16.3). Acid β_1 glycoprotein, oromucoid được deasialylate bằng cách xử lý với neuraminidase tạo nên asialoorosomucoid (ASOR), một ligand ái lực cao cho ASPr. Sau đó Poly-L-lysine (PL) lại liên kết đồng hóa trị với protein do sự hình thành liên kết amide qua trung gian carbodiimide. Do cộng hợp ASOR-PL nên các DNA tích điện âm không bị mất sự tương tác tĩnh điện và nó được bảo vệ khỏi sự phân giải của nuclease. Phức hợp này được chọn lọc và được hòa nhập nhanh chóng vào các tế bào gan bởi tiêu hóa nội bào qua trung gian receptor và các gen ngoại lai sẽ được biểu hiện *in vitro* và *in vivo*. Để tăng cường hơn nữa sự biểu hiện gen ngoại lai *in vivo*, thủ thuật cắt một phần gan sẽ làm kích thích việc nhân lên của các tế bào gan. Cơ chế này được chỉ rõ là do phá vỡ mạng lưới vi ống cần cho sự chuyển vị của endosome tới lysosome và cũng có thể do sự xử lý của colchicine.



Hình 16.3 Sử dụng asialoglycoprotein (ASGP) nhắm tới các gen của gan. Các receptor asialoglycoprotein chỉ có nhiều trên màng sinh chất của các tế bào gan và gắn với các glycoprotein có galactose tận cùng với ái lực cao. Poly-L-lysine tích điện âm liên kết đồng hóa trị với ASGP do sự hình thành liên kết amide qua trung gian carbodiimide. Do cộng hợp ASOR-PL liên kết với DNA tích điện âm nên tương tác tĩnh điện không bị mất đi. Phức hợp này được hòa nhập vào trong các tế bào gan bởi tiêu hóa nội bào qua trung gian receptor. Sau khi tiêu hóa nội bào, ligand này tách ra khỏi receptor thì receptor này lại quay trở lại bề mặt tế bào. Sự chuyển vị của endosome tới lysosome đòi hỏi mạng lưới vi ống phải còn nguyên vẹn. Sau khi hòa lẫn endosome và lysosome thì DNA được giải phóng khỏi vật mang của nó ở pH thấp hơn. Một phần DNA trốn khỏi lysosome để tới nhân, ở đó nó có thể được phiên mã thành mRNA. (Theo Christy L. Schilling, Martin J. Schuster và George Wu. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

16.4 Những ứng dụng lâm sàng của GTL trực tiếp bệnh tăng cholesterol có tính chất gia đình tại gan (FH)

16.4.1 Bệnh tăng cholesterol có tính chất gia đình (familial hypercholesterolemia –FH)

Đó là một bệnh trội NST thường, nó tác động với tỷ số 1/500 người. Bệnh gây nên do sự khiếm khuyết gen receptor lipoprotein tỷ trọng thấp của gan (low-density lipoprotein – LDL). Khi giảm hoạt tính của receptor LDL sẽ dẫn đến sự thải loại kém hiệu quả các hạt LDL bởi gan, vì thế làm hạn chế sự chuyển hóa của LDL. Vì nguyên nhân này nên mức cholesterol LDL huyết tăng cao, sớm dẫn đến bệnh mạch vành. Các thể dị hợp tử của FH chỉ duy trì được một phần chức năng receptor LDL bình thường, và vì thế mà mức LDL thường gấp đôi so với người bình thường. Các thể đồng hợp tử có 2 gen receptor đột biến thì chỉ có 0 đến 20% hoạt tính receptor LDL bình thường và rõ ràng là mức cholesterol huyết thanh tăng lên rất nhiều. Trong những trường hợp này nếu không được điều trị thì thường chết do nhồi máu cơ tim trước tuổi 20.

Trên thực tế, các receptor LDL có ở tất cả các tế bào, tuy nhiên sự biểu hiện các receptor ở gan lại giữ vai trò chính trong việc điều hòa lượng cholesterol huyết thanh. Nhưng gan chỉ là một tổ chức có khả năng chuyển đổi cholesterol thành acid mật và bài tiết chúng ra khỏi cơ thể. Dược lý trị liệu với các bệnh nhân FH dị hợp tử - những người biểu hiện receptor LDL ở mức thấp thì phải điều hòa lên sự biểu hiện gen receptor LDL. Các thuốc điều trị bao gồm các chất ức chế 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase và các chất liên kết acid tác động làm giảm cholesterol tự do ở nội bào tế bào gan. Những thuốc này ảnh hưởng tới sự biểu hiện gen receptor LDL, tăng chuyển hóa LDL do đó làm giảm cholesterol huyết thanh. Tuy nhiên, việc xử lý này phải kết hợp với chế độ ăn kiêng giảm một cách chính xác lượng cholesterol, điều này chỉ khả thi trong trường hợp dị hợp tử và cũng không giảm được mức cholesterol tới mức bình thường. Đối với những bệnh nhân không biểu hiện receptor chức năng vì lý do đồng hợp tử hoặc dị hợp tử, dược lý trị liệu không có hiệu ứng thì chỉ còn cách là điều trị bằng huyết thanh đã tinh chế kéo dài hàng tuần hoặc phải ghép gan. Cả hai liệu trình này đều rất tốn kém và việc ghép gan còn bị giới hạn bởi rất nhiều yếu tố gây nguy hiểm tới tính mạng cũng như việc cung ứng mô để ghép cũng còn rất nhiều hạn chế. Vì những lý do này nên GTL gan được ứng dụng trong trường hợp FH.

Những thí nghiệm từ sớm trên thỏ có lipid cao có thể di truyền được Watanabe (Wanatabe heritable hyperlipidemic – WHHL) - một mô hình động vật với FH đã chứng minh sự thành công của GTL bệnh FH *ex vivo*. Trong những nghiên cứu này, các tế bào gan được thu lượm rồi được công nghệ hóa *ex vivo* với các retrovirus có chứa gen receptor LDL nguyên vẹn rồi truyền lại cho động vật này. Các thí nghiệm đối chứng với các tế bào gan được thâm nhiễm giả cho thấy không làm giảm cholesterol mà lại tăng tức thời mức cholesterol huyết thanh, điều này cũng có thể là do phẫu thuật. Các tế bào gan thâm nhiễm retrovirus được ghép ổn định vào gan động vật thì mức cholesterol huyết thanh dần dần xuống thấp hơn. Hiệu ứng này quan sát thấy trong 6,5 tháng thực nghiệm. Những thí nghiệm sau này với chó và khỉ đầu chó cho những kết quả rất khích lệ. Trong trường hợp khỉ đầu chó, sau 1,5 tháng GTL các gen chuyển vẫn còn biểu hiện. Những kết quả thí nghiệm ban đầu đã củng cố thêm tính hiệu lực của phương pháp điều trị này và

dọn đường cho các thử nghiệm lâm sàng trên người. Một phụ nữ Canada nói tiếng Pháp 28 tuổi là người đầu tiên được thực hiện GTL trực tiếp gan. Trường hợp của cô là đồng hợp tử thể đột biến gen receptor LDL, hậu quả là biểu hiện một receptor không có chức năng. Sau khi bị nhồi máu cơ tim ở tuổi 16, cô bị bệnh động mạch vành cho tới tuổi 26. Nồng độ LDL huyết thanh của cô là 482 mg/dl (bình thường là 194 ± 34), lượng lipid mốc huyết thanh của cô không giảm khi trị liệu bằng các thuốc truyền thống. Phần trái gan bệnh nhân chiếm khoảng 15% tổng khối lượng gan được cắt bỏ và các tế bào nhu mô được phân lập ra. Các tế bào này sau đó được tải nạp với vec tơ retrovirus chứa gen receptor LDL người có độ dài đầy đủ dưới sự kiểm soát của promoter β -actin gà và yếu tố tăng cường cytomegalovirus (CMV). Để chọn ra những tế bào đã được tải nạp người ta phân tích bằng khả năng hấp thụ huỳnh quang của các LDL đánh dấu. Chỉ những tế bào gan đã biến đổi gen mới được truyền lại qua tuần hoàn cửa chính (Hình 16.4). Bệnh nhân này dung nạp tốt và không xuất hiện tác dụng phụ. Ngay sau khi truyền các tế bào biến đổi gen, LDL huyết thanh bệnh nhân đã xuống tới 180mg/dl. Một mốc mới được thiết lập thấp hơn 17% so với trước khi GTL. Vì LDL giảm nên mức lipoprotein tỷ trọng cao (high-density lipoprotein- HDL) lại tăng, nâng tỷ số LDL/HDL từ $11 \pm 0,4$ xuống $7,9 \pm 0,9$. Cũng không hiểu tại sao HDL lại tăng mặc dầu hiện tượng này cũng thấy ở những bệnh nhân đã ghép gan. Bệnh nhân này cũng đáp ứng với thuốc lovastatin, thuốc này trước khi GTL không có hiệu ứng. Điều này chỉ rõ rằng đáp ứng với lovastatin có liên quan tới sự điều hòa sau phiên mã - một cơ chế đã được chứng minh ở các nghiên cứu trước. Đáp ứng của lovastatin làm giảm mức LDL huyết thanh của bệnh nhân xuống tới 356 ± 22 mg/dl và hiệu ứng này được ổn định 2,5 năm.

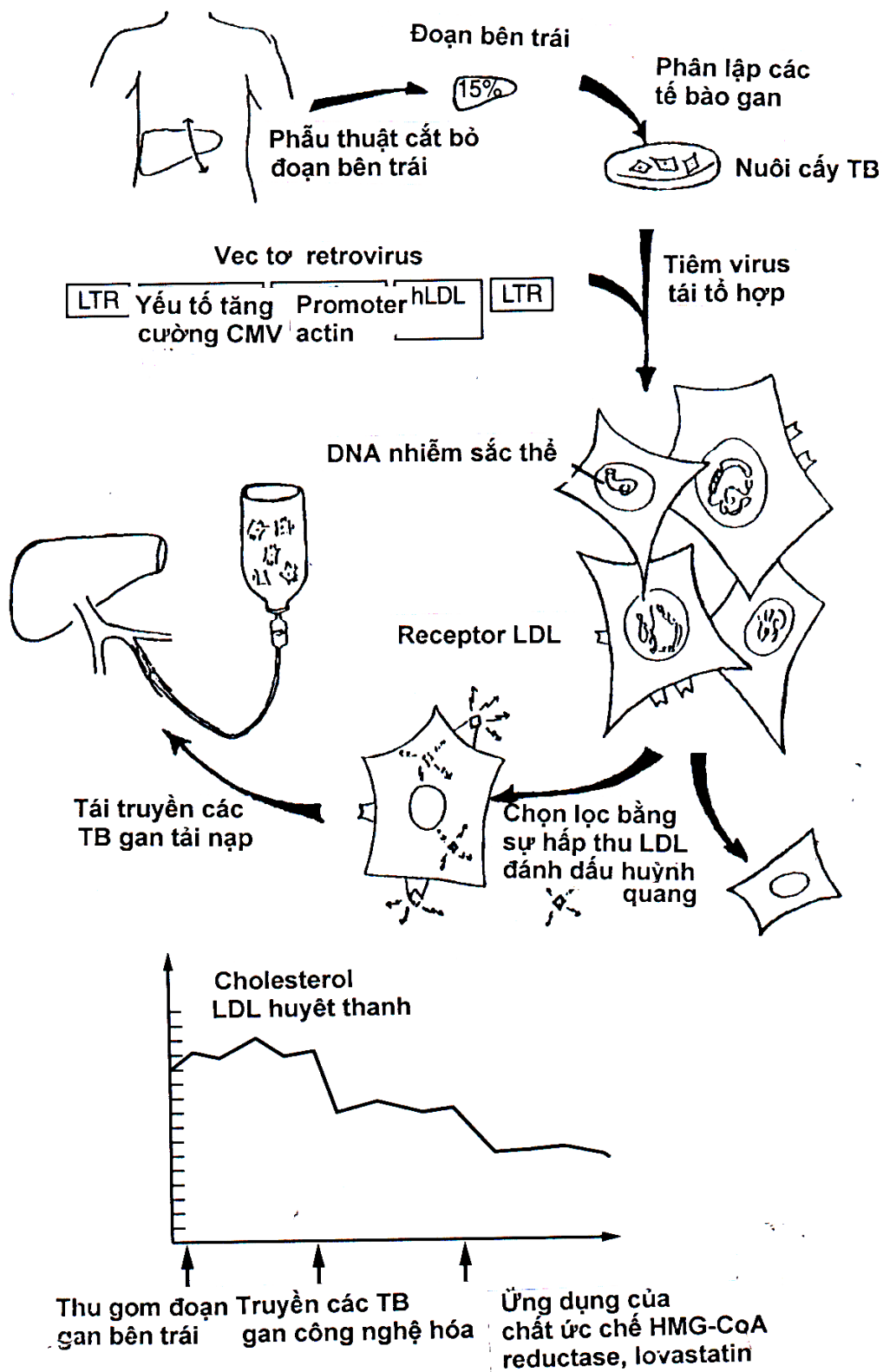
Không thấy có ĐUMD với các receptor tái tổ hợp. Huyết thanh của bệnh nhân này không có kháng thể với receptor tái tổ hợp khi phân tích với Western blot. Cũng không thấy các bằng chứng về viêm gan tự miễn sau GTL. Mở rộng nghiên cứu này với 4 bệnh nhân FH khác, trong đó 2 bệnh nhân âm tính receptor cũng được xử lý theo cách tương tự. Người ta quan sát thấy rằng các tế bào gan đã tải nạp tốt cũng như sự biểu hiện gen chuyển thấy ở tất cả bệnh nhân mà không kèm theo các tác dụng phụ. Hai trong 4 bệnh nhân đã cải thiện một cách đáng kể mức lipid huyết thanh, giảm LDL huyết thanh tối đa tới mức 150 mg/dl ở một số bệnh nhân âm tính receptor. Không có bệnh nhân nào phát triển ĐUMD với gen chuyển hoặc với protein retrovirus. Mặc dầu sự chuyển gen đã thấy ở tất cả các bệnh nhân, nhưng tác động lâm sàng thì vẫn còn thấp vì mức cholesterol huyết thanh vẫn vượt trên mức bình thường. Nói tóm lại, những thử nghiệm lâm sàng đầu tiên đã chỉ ra tính khả thi của GTL với FH *ex vivo*, nhưng cũng nhấn mạnh rằng cần phải có những cải tiến thật sự để nâng cao tỷ lệ tế bào gan được tải nạp cũng như mức độ và thời gian biểu hiện gen.

Trong một nghiên cứu khác, sự chuyển gen *in vivo* được thực hiện trên thỏ WHHL. Gen receptor LDL người được đặt dưới sự kiểm soát của các yếu tố phiên mã từ gen albumine chuột để biểu hiện hiệu quả trong các tế bào gan. Cấu trúc này được cộng hợp qua poly-L-lysine và ASOR - một ligand ái lực cao với receptor ASOR. Sau khi tiêm hệ thống phức hợp này, phân tích thỏ WHHL thấy cộng hợp DNA - protein được hấp thu nhanh và đặc hiệu sau khi đã biểu hiện gen chuyển. Cholesterol huyết thanh toàn phần của thỏ cũng giảm tức khắc xuống tới 153 ± 53 mg/dl. Trong các thí nghiệm đối chứng, động vật được tiêm một cấu trúc có mang gen nghiên cứu CAT (chloramphenicol acetyltransferase) thay vì gen receptor LDL thì thấy biểu hiện CAT, nhưng mức cholesterol huyết thanh không giảm. Trong nghiên cứu này chỉ biểu hiện được 2 đến 4% mức receptor LDL nội sinh và

hiệu ứng đối với lipid chỉ kéo dài dưới một tuần lễ. Những kết quả nghiên cứu khởi đầu này đã được khích lệ bởi tính đặc hiệu đối với sự chuyển gen. Tuy nhiên, cũng thật không vui vì mức độ và thời gian biểu hiện tái tổ hợp ngắn.

Hình 16.4 Gen trị liệu sự thiếu hụt receptor LDL. Phần gan bên trái của một bệnh nhân đồng hợp tử với thể đột biến gen receptor LDL được cắt ra và các tế bào gan được phân lập. Những tế bào này được tải nạp trong nuôi cấy với vec tơ retrovirus có chứa gen receptor LDL người có độ dài đầy đủ dưới sự kiểm soát của promoter β -actin gà và một yếu tố tăng cường cytomegalovirus (CMV). Những tế bào tải nạp thành công được chọn ra bằng cách dùng LDL đánh dấu huỳnh quang. Chỉ những tế bào gan đã biến đổi gen mới được truyền lại cho bệnh nhân qua tuần hoàn của chính. Nồng độ LDL huyết thanh mốc là 482 mg/dl. Ngay sau khi truyền các tế bào gan, LDL huyết thanh của bệnh nhân rơi xuống gần 180 mg/dl. Ngoài ra bệnh nhân còn đáp ứng với lovastatin - một chất ức chế HMG-CoA reductase mà trước khi GTL thì không có hiệu ứng. Mức LDL huyết thanh của bệnh nhân giảm ổn định trên 2,5 năm.

(Theo Christy L. Schilling, Martin J. Schuster và George Wu. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001) (Hình trang sau)

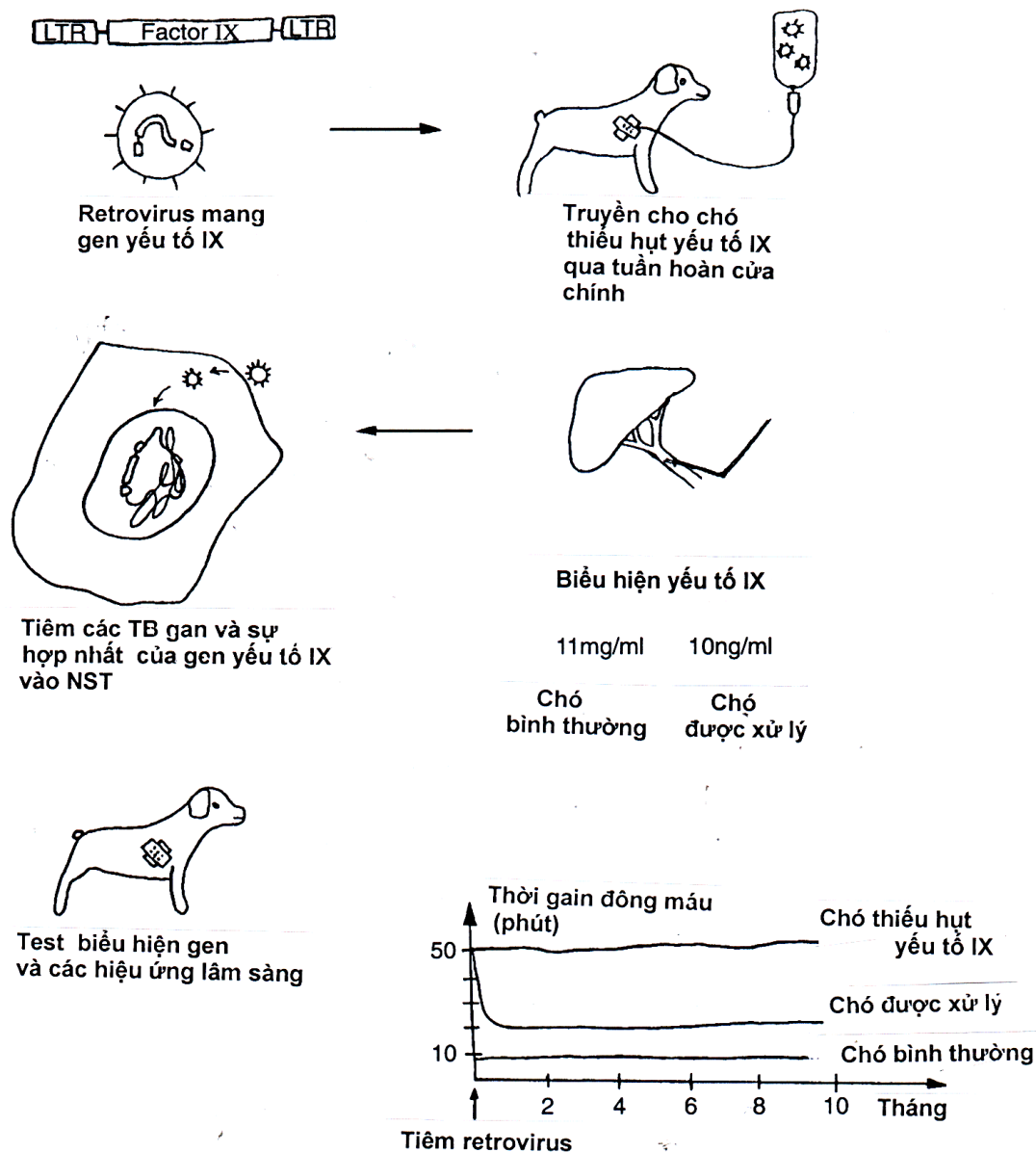


Trong các nghiên cứu trên động vật gần đây người ta đã sử dụng adenovirus tái tổ hợp để chuyển trực tiếp gen receptor LDL tới gan, vì thế nó có khả năng hoàn trả sự biểu hiện receptor LDL ở thỏ WHHL và chuột knock-out receptor LDL, dẫn đến giảm thật sự mức cholesterol huyết thanh. Tuy nhiên, sự biểu hiện của receptor tái tổ hợp này cũng như hiệu ứng trên lipid chỉ là nhất thời. Sở dĩ như vậy là do ĐUMD của vật chủ kháng lại sự biểu hiện protein virus dù với mức thấp và dần dần làm hủy hoại các tế bào đã biến đổi gen. Đặc biệt với các đối tượng âm tính receptor thì sự biểu hiện receptor LDL cũng có thể sinh ra ĐUMD kháng lại các protein mới mà sau này sẽ làm giảm sự biểu hiện gen chuyển. Để khắc phục vấn đề này, một nhóm nghiên cứu khác đã chuyển gen receptor lipoprotein tỷ trọng rất thấp (very low density lipoprotein -VLDL) tới gan chuột knock-out receptor LDL nhờ sử dụng adenovirus tái tổ hợp. Vì receptor VLDL đã biểu hiện sẵn trong các mô ngoài gan nên không có ĐUMD với các receptor này sau khi biểu hiện ở gan. Receptor VLDL cũng gắn với LDL với ái lực thấp, nó làm trung gian cho sự hấp thu VLDL, cũng như các tiền thân của LDL và vì vậy làm giảm cholesterol huyết thanh.

16.4.2 Bệnh ưa chảy máu hemophilia B

Bệnh ưa chảy máu hemophilia B là một bệnh do thoái hóa sự đông máu liên quan tới nhiễm sắc thể x, gây nên sự thiếu hụt hoặc khiếm khuyết chức năng yếu tố đông máu IX. Cuộc sống của bệnh nhân thường bị đe dọa nếu không được truyền thường xuyên yếu tố IX. Nếu các sản phẩm được truyền làm kỹ các test thì có thể khắc phục được sự không tinh sạch, nhưng cách điều trị này vẫn còn nhiều rủi ro bị nhiễm virus khi truyền huyết tương như virus viêm gan C và HIV. Ngoài ra, đời sống bán phần của yếu tố IX cũng chỉ 24 giờ, vì thế thường phải truyền lặp lại nhiều lần. Gan là nguồn sơ cấp của yếu tố IX và là đích đầu tiên của GTL hemophilia B.

Cho tới nay người ta đã tạo được nhiều hệ thống động vật sử dụng trong *ex vivo*. Một mô hình trên chó là rất đặc trưng và đã được sử dụng trong các thử nghiệm tiền lâm sàng hemophilia B. Những chó này không có hoạt tính của yếu tố IX do một đột biến sai ở domain xúc tác. Người ta dùng vec tơ retrovirus có chứa gen yếu tố IX chó dưới sự kiểm soát của promoter retrovirus và các yếu tố tăng cường để chuyển trực tiếp tới gan chó qua đường tuần hoàn. Các phân tích ELISA và các thí nghiệm sinh học cho thấy yếu tố IX đã đạt tới mức 2-10ng/ml trong huyết tương. Ở chó bình thường, mức này vào khoảng 11,5 μ g/ml. Khi yếu tố IX chưa đạt mức của chó hoang dã thì đã thấy có sự cải thiện đặc biệt các thông số sinh hóa của sự đông máu. Điều này đã được chứng minh qua thời gian đông máu toàn phần (whole blood clotting time - WBCT),



Hình 16.5 Gen trị liệu sự thiếu hụt yếu tố IX. Vec tơ retrovirus tái tổ hợp là một cấu trúc có chứa gen yếu tố IX của chó dưới sự kiểm soát của promoter retrovirus và các yếu tố tăng cường (LTR). Vec tơ này được truyền vào tuần hoàn cửa chính của chó không phát hiện thấy có hoạt tính của yếu tố IX. Retrovirus được hấp thu bởi các tế bào gan và DNA provirus sẽ hợp nhất vào trong DNA nhiễm sắc thể. Các phân tích huyết tương chó bằng ELISA cho thấy yếu tố IX huyết tương đạt mức 2 - 10ng/ml. Chó bình thường mức yếu tố IX huyết tương khoảng 11,5 μ g/ml. Khi yếu tố IX ở chó đã được điều trị chưa đạt tới mức của chó hoang dã thì đã có sự cải thiện đáng kể về thời gian đông máu toàn phần.

(Theo Christy L. Schilling, Martin J. Schuster và George Wu. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

trong đó chó bình thường là 6-8 phút. Ở chó hemophilia B thì WBCT khoảng 45-50 phút. Sau khi được GTL, thời gian này giảm xuống hơn 50%, tức là xuống mức 18-22 phút. Mặc dầu nồng độ của yếu tố IX chỉ tăng chút ít, nhưng nó đã cải thiện đáng kể thời gian đông máu. Hơn nữa, hiệu ứng này còn được ổn định trên 9 tháng.

Các vec tơ adenovirus biểu hiện yếu tố IX chó cũng được sử dụng để điều trị cho chó bị hemophilia B. Các hạt virus ($2,4 \times 10^{12}$) đã được truyền vào hệ mạch cửa chính của chó. Những động vật này đã tạo được 2-3 lần mức yếu tố IX của dạng hoang dã. Tuy nhiên, hiệu ứng này cũng vẫn chỉ là nhất thời mà thôi. Việc tăng nồng độ yếu tố IX không làm bình thường hóa thời gian đông máu, nhưng điều đáng nói là phải sau 2 tháng thì mức độ và các thông số lâm sàng mới trở lại mức trước điều trị. Khi sử dụng lặp lại, cần lưu ý khả năng sẽ có một ĐUMD ở liệu trình kế tiếp.

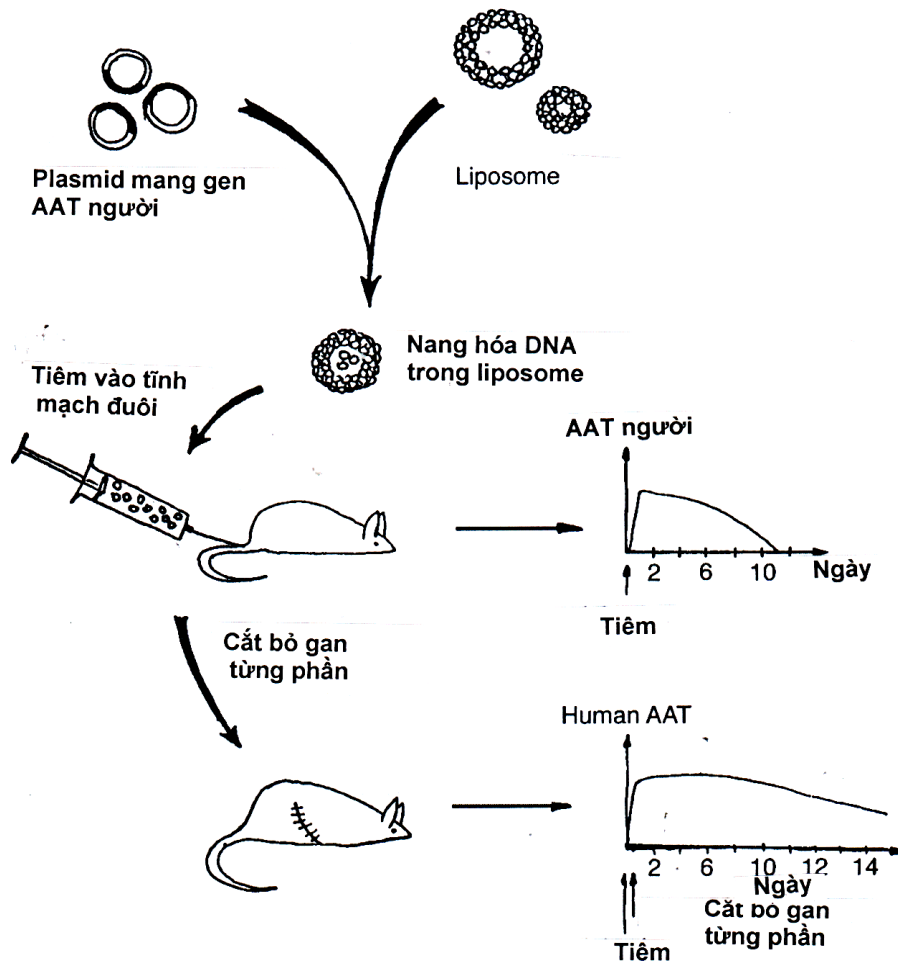
Một nhóm nghiên cứu khác lại sử dụng vec tơ virus adeno liên hợp (AAV) để biểu hiện yếu tố IX của người trong gan chuột. Họ tiêm một cách đơn giản vào tĩnh mạch đuôi chuột vec tơ tái tổ hợp sau khi đã tia xạ bằng tia γ ở gan. Như đã đề cập ở trên, cách điều trị này có lẽ là nhằm kích thích tế bào phân chia, vì thế mà nâng cao hiệu lực của GTL với virus adeno liên hợp. Nồng độ yếu tố IX của người trong chuột tải nạp với vec tơ AAV vào khoảng giữa 0,1 và 1 ng/ml. Kết quả này cũng tương tự như trong mô hình ở chó. Giá trị bình thường yếu tố IX của người là 5 $\mu\text{g/ml}$, trong khi đó với mức khoảng 100 ng/ml đã phòng ngừa được các bệnh mạn tính.

16.4.3 Bệnh thiếu hụt α_1 -antitrypsin

α_1 -antitrypsin (AAT) là một glycoprotein huyết thanh được tổng hợp chủ yếu ở gan rồi tiết vào máu. Nó là một chất ức chế protease, chức năng của nó là bảo vệ bề mặt túi phổi khỏi bị phân hủy bởi protease. Cơ chất chính của nó là neutrophil elastase (NE), được giải phóng từ các bạch cầu trung tính (neutrophil) khi thực bào, nó làm xáo trộn màng hoặc ly giải tế bào và phân cắt các protein nền (matrix) mô liên kết định vị ở các thành túi phổi. Ở những người bình thường, mức AAT đủ để trung hòa NE tuần hoàn. Sở dĩ có nhiều dạng thiếu hụt AAT là do giảm lượng chất ức chế protease trong huyết tương và không trung hòa hết NE. Điều này được biểu lộ là rủi ro cao với chứng khó thở phổi gây nên bởi sự phân giải chất nền ngoại bào của phổi. Gen bình thường của AAT được thiết kế là M và có 95% alen ở quần thể người Mỹ Caucase. Thể đột biến thông thường nhất là Z và S, xảy ra với tần số alen lần lượt là 1-2% và 2-4% trong quần thể này. Ngược lại, những người Mỹ gốc Châu Á hoặc Châu Phi chỉ chịu tác động rất thấp. Những cá thể đồng hợp tử alen Z chỉ có 10-15% AAT tuần hoàn và chỉ chịu những rủi ro nhất định về chứng khó thở phổi. Những cá thể đồng hợp tử alen S và MS hoặc dị hợp tử SZ cũng tăng rủi ro khó thở phổi. Dị hợp tử được gọi là alen null thì thiếu hoàn toàn AAT huyết tương và những bệnh nhân này cực kỳ dễ phát triển khó thở. Các dị hợp tử mang alen S và Z cùng với alen null thì cũng có các triệu chứng như vậy. Nhiều thể đột biến khác có thể là do đáp ứng với alen null với thang từ đột biến điểm đến đột biến toàn phần. Khoảng 10% cá thể đồng hợp tử với alen Z lại phải chịu thêm rủi ro nữa là tổn thương lớn gan lâm sàng, có lẽ do sự tích tụ các AAT không gấp nếp trong lưới nội chất ER của các tế bào gan.

Phương pháp điều trị hiện tại đối với thiếu hụt AAT là đưa gen qua tĩnh mạch hoặc hít qua khí quản AAT người được chế từ huyết thanh. AAT người tái tổ hợp được tổng hợp trên vi khuẩn hay nấm men có điều bất tiện là đời sống bán phần ngắn hơn và phải tăng cường

sự làm sạch cho thận vì sự glycosyl hóa sau phiên dịch không thích hợp. Trong khi đó nếu sử dụng AAT người sẽ làm tăng hoạt tính AAT huyết thanh trong các bệnh nhân. Tuy nhiên đáp ứng này chỉ là nhất thời, còn sự tác động có tính chất phòng ngừa sự hủy hoại phổi thì vẫn phải truyền tĩnh mạch hay hít qua khí quản AAT. Một bệnh khác của thiếu hụt α_1 -antitrypsin là ứng cử viên của trị liệu thay thế gen, các gen chuẩn được chuyển tới các tế bào gan làm cho việc sản xuất AAT ổn định dài hạn. Người ta đã hiệu chỉnh bệnh này với các thí nghiệm trên chó, ở đó các gen chuẩn đã được đưa vào bằng phương thức *ex vivo*. Sau khi cấy ghép các tế bào gan đã tải nạp retrovirus thì các tế bào này đã đạt tới đỉnh điểm sản xuất AAT ở ngày thứ 10 sau khi cấy ghép. Tuy nhiên, mức này sẽ xuống thấp dần và khoảng 47 ngày sau thì không phát hiện thấy nữa.



Hình 16.6 Gen trị liệu thiếu hụt α_1 -antitrypsin (AAT). Plasmid chứa gen AAT người đủ độ dài được đóng trong các liposome nhỏ. Các liposome này được tiêm vào tĩnh mạch đuôi chuột. Một liều đơn plasmid chuyển giao qua liposome đã cảm ứng việc sản xuất AAT người ở các tế bào gan chuột và kết quả là có thể đo được mức AAT người trong huyết tương chuột trong 11 ngày. Nếu cắt bỏ một phần gan sau 3 giờ tiêm tĩnh mạch phức liposome thì mức AAT tăng lên đáng kể.

(Theo Christy L. Schilling, Martin J. Schuster và George Wu. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Một nghiên cứu khác *in vivo* lại sử dụng các liposome nhỏ để chuyển gen. Một plasmid chứa gen α_1 -antitrypsin người có độ dài đầy đủ được bọc trong các liposome nhỏ rồi tiêm vào tĩnh mạch chuột. Một liều đơn plasmid chuyển giao qua liposome đã cảm ứng sản xuất AAT người trong các tế bào gan chuột và kết quả là có thể đo được mức AAT trong huyết tương chuột tới tận ngày thứ 11. Trong các thí nghiệm đối chứng, người ta tiêm plasmid tự do (đơn thuần) thì không thấy sự biểu hiện AAT (Hình 16.6).

Điều thú vị là không có hiệu ứng phụ nào khi cộng chuyển với phức liposome. Tuy nhiên, sau khi truyền vào tĩnh mạch phức hợp này 3 giờ mà lại tiến hành cắt một phần gan thì sẽ làm tăng đáng kể sự hình thành AAT huyết tương. Ngày thứ 11 sau khi tiêm tĩnh mạch, mức AAT người đã tăng 6,4 lần so với những động vật không cắt gan. Chưa rõ tại sao khi sử dụng lặp lại thì không làm tăng sự biểu hiện gen nữa. Cũng chưa hiểu đầy đủ tại sao sự kích thích tăng sinh tế bào do cắt một phần gan lại làm tăng sự biểu hiện gen. Có thể là do cơ chế làm thay đổi sự phân chia của DNA chuyển giao qua liposome trong các tế bào để trốn thoát khỏi sự phân giải của lysosome.

16.4.4 Hội chứng Crigler- Najjar (thiếu hụt bilirubin UDP-D Glucuronosyltransferase)

Bilirubin là sản phẩm thoái hóa chính của nhóm heme. Enzyme xúc tác gắn bilirubin với acid glucuronic là bilirubin UDP –glucuronosyltransferase –B-UGT). Nguyên mẫu của bệnh liên quan tới bilirubin có thể di truyền là hội chứng Crigler-Najjar (CN) type I. Những bệnh nhân có thoái hóa di truyền này được đặc trưng bởi mức bilirubin không liên hợp cao trong huyết thanh (HT), có ít hoặc không có sắc tố liên hợp trong mật. Họ không đáp ứng với trị liệu cảm ứng enzyme bằng phenobarbital và bị hủy hoại rất nhiều về thần kinh như cử động bất bình thường, không nghe được, vàng nhân não (kernicterus) và cuối cùng là chết. Hiện tại điều trị có tính chất quyết định đối với bệnh này là ghép gan. Người ta thấy một sự khiếm khuyết tương tự có ở chuột Gunn, nó là đồng hợp tử với thể đột biến và vì thế không có hoạt tính B-UGT gan. Những con chuột này sống lâu dài với bilirubin huyết cao và phát triển bệnh não bilirubin. Chúng sẽ cho một hệ mô hình nghiên cứu về hiệu lực của GTL hội chứng Crigler – Najjar type I.

Một ví dụ về hiệu chỉnh *in vivo* khiếm khuyết này là chuyển gen B-UGT người tới gan chuột Gunn nhờ sử dụng cộng hợp asialoglycoprotein poly-L-lysine – DNA như đã mô tả trước đây. Khi có chiến lược nhằm kéo dài thời gian biểu hiện của gen chuyển thì ta phải hiểu rằng sự chuyển vị từ endosome tới lysosome sẽ là một bộ phận của sự phân giải nội bào đòi hỏi một mạng lưới vi ống nguyên vẹn. Colchicine – một tác nhân gây nhiễu vi ống đã được đưa vào 30 phút trước khi tiêm phức hợp ASOR-DNA để ngăn chặn sự chuyển vị của các bong endosome có chứa ligand của lysosome. Sự chuyển đích của B-UGT dưới các điều kiện này đã kéo dài được việc chuyển DNA tới gan tới 10 tuần. Bilirubin glucuronide được tiết vào mật và sẽ giảm xuống khoảng 25-35% trong 2-4 tuần và vẫn duy trì giảm trong 8 tuần nữa. Nếu không được xử lý với colchicine thì DNA chỉ duy trì ở gan 2 ngày và không có hiệu ứng về mức bilirubin HT. Những nghiên cứu này đã sử dụng một nồng độ colchicine đến mức gây độc cho người. Tuy nhiên, chưa có thứ thuốc nào khác có thể tạo được cùng hiệu ứng nhưng lại an toàn cho các thử nghiệm lâm sàng trên người. Cuối cùng, để tránh các tác dụng phụ và sự phân phối sinh học lan tỏa quá rộng, colchicine cũng có thể được chuyển theo một phương thức đặc hiệu gan. Theo cách này thì sự gây

nhiều vi ống là phương pháp không gây ảnh hưởng tới sự kéo dài hiệu ứng của GTL đặc hiệu gan.

Như đã trình bày ở trên, các adenovirus tái tổ hợp có hiệu lực trong việc chuyển các gen ngoại lai tới các tế bào nằm yên không phân chia và khi sử dụng hệ vec tơ này có thể biểu hiện gen ở mức cao. Tuy nhiên, vì DNA của chúng không hợp nhất vào hệ gen vật chủ nên sự phân phối kế tiếp là điều cần thiết. Vì vậy, thường là ĐUMD xuất hiện sau lần tiêm đầu tiên sẽ được đánh lừa. Chuột Gunn đã được nhắm vào mục đích này. Gen *B-UGT* người đã được chuyển từ trước qua adenovirus tái tổ hợp có hiệu ứng với thời gian ngắn. Những động vật được xử lý đã tiết bilirubin glucuronide và giảm 70% mức bilirubin HT. Tuy nhiên, hiệu ứng này cũng chỉ là nhất thời vì có ĐUMD kháng lại KN adenovirus. Hiệu ứng tương tự cũng thấy trong các áp dụng kế tiếp với cùng loại động vật vì có các kháng thể trung hòa. Một nhóm nghiên cứu đã phát hiện rằng việc phân phối adenovirus tái tổ hợp trong thời kỳ sơ sinh có thể cảm ứng sự dung nạp với adenovirus tái tổ hợp. Những con chuột Gunn (1- 3 ngày tuổi) được tiêm 1×10^8 pfl adenovirus tái tổ hợp có mang gen *B-UGT* người. Các mũi tiêm kế tiếp được thực hiện sau 56 và 112 ngày. Các thí nghiệm đối chứng với việc sử dụng adenovirus tái tổ hợp có chứa gen nghiên cứu *Lacz*. Những động vật được nhận B-UGT (chứ không phải là *Lacz*) đã giảm mức bilirubin HT khoảng 70-76% khi so sánh với các động vật không được xử lý. Cũng thấy có sự tăng dần mức bilirubin HT tới ngày 53, nhưng khi tiêm lần 2 và 3 adenovirus tái tổ hợp lại có thêm một hiệu ứng bổ sung cho mức bilirubin HT. Các phân tích đã chỉ rõ rằng không phát hiện thấy các kháng thể và hoạt tính của các tế bào lympho độc tế bào đối với adenovirus tái tổ hợp. Điều này chứng minh rằng tiêm adenovirus tái tổ hợp trong thời kỳ sơ sinh thì động vật được dung nạp và cho phép GTL dài hạn với việc sử dụng lặp lại adenovirus tái tổ hợp.

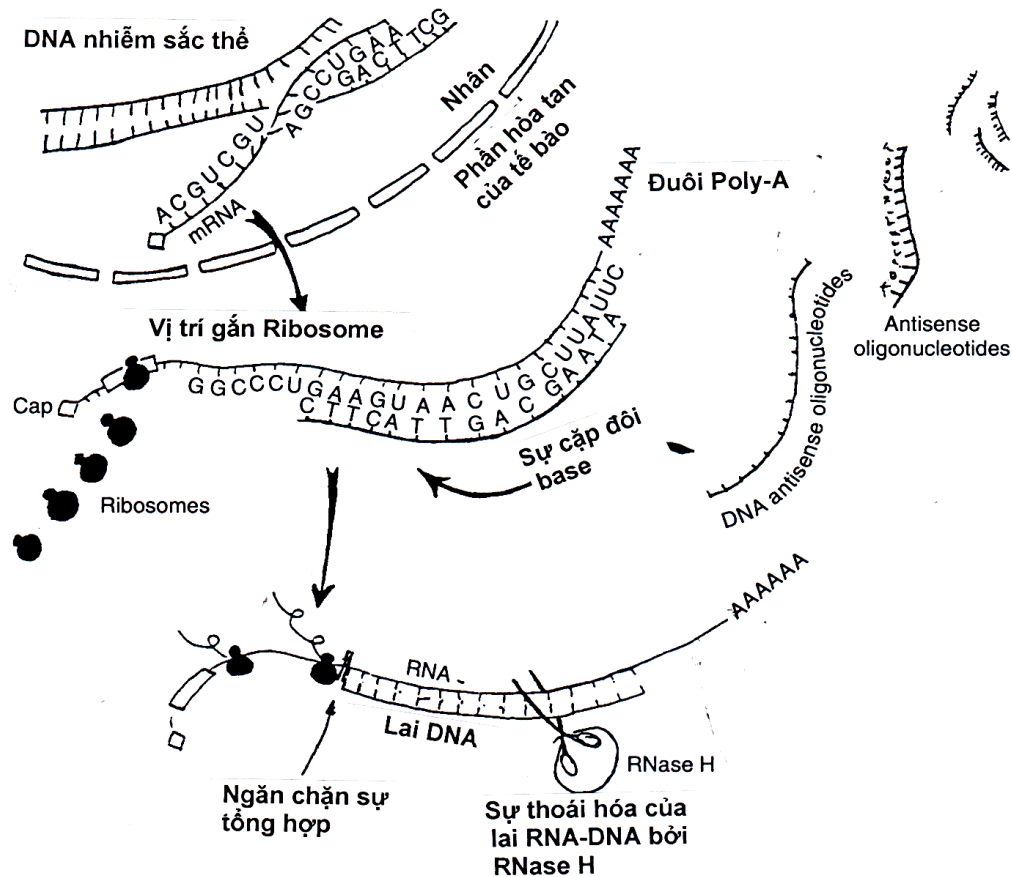
Một vấn đề có liên quan tới điều trị là nếu có sự cảm ứng dung nạp của adenovirus thì có thể cũng dung nạp được các virus hoang dã. Sự thâm nhiễm virus là điều rất bình thường đối với cuộc sống của một con người, nó thường được biểu lộ như các bệnh có thể tự giới hạn được và không phức tạp. Cũng nhóm nghiên cứu này đã tiêm 2 liều virus hoang dã vào chuột Gunn đã có dung nạp từ trước với các liều adenovirus tái tổ hợp ngay từ thời kỳ sơ sinh. Những động vật này đã có ĐUMD lympho T độc tế bào sau lần tiêm đầu tiên virus hoang dã và nó càng tăng lên sau lần tiêm thứ hai. Điều thú vị là những động vật này tiếp tục biểu hiện gen chuyển B-UGT và không thấy tăng mức bilirubin HT không liên hợp.

16.5 Gen trị liệu với thâm nhiễm virus

Trái ngược với nhiều chiến lược GTL khác, mục tiêu chính của việc thay thế các gen khiếm khuyết trong trị liệu thâm nhiễm virus bằng kỹ thuật trị liệu gen là ức chế sự sao chép hay phiên mã của virus hoặc sự phiên dịch (tổng hợp) các gen virus hoặc sự lắp ráp các hạt virus. Nếu đã biết các trình tự acid nucleic của virus thì người ta thiết lập một antisense oligonucleotide gồm các chuỗi đơn ngắn của DNA để gắn tương ứng với mRNA (tức là chuỗi có nghĩa) do sự bổ cứu các cặp base. Do vậy có thể làm ức chế trực tiếp sự phiên dịch hoặc các thành phần RNA của phân tử lai RNA-DNA bị phân cắt bằng RNase nội bào (Hình 16.7). Antisense oligonucleotide thường có 15-20 base và được tạo ra bằng một phương tiện tổng hợp DNA tự động.

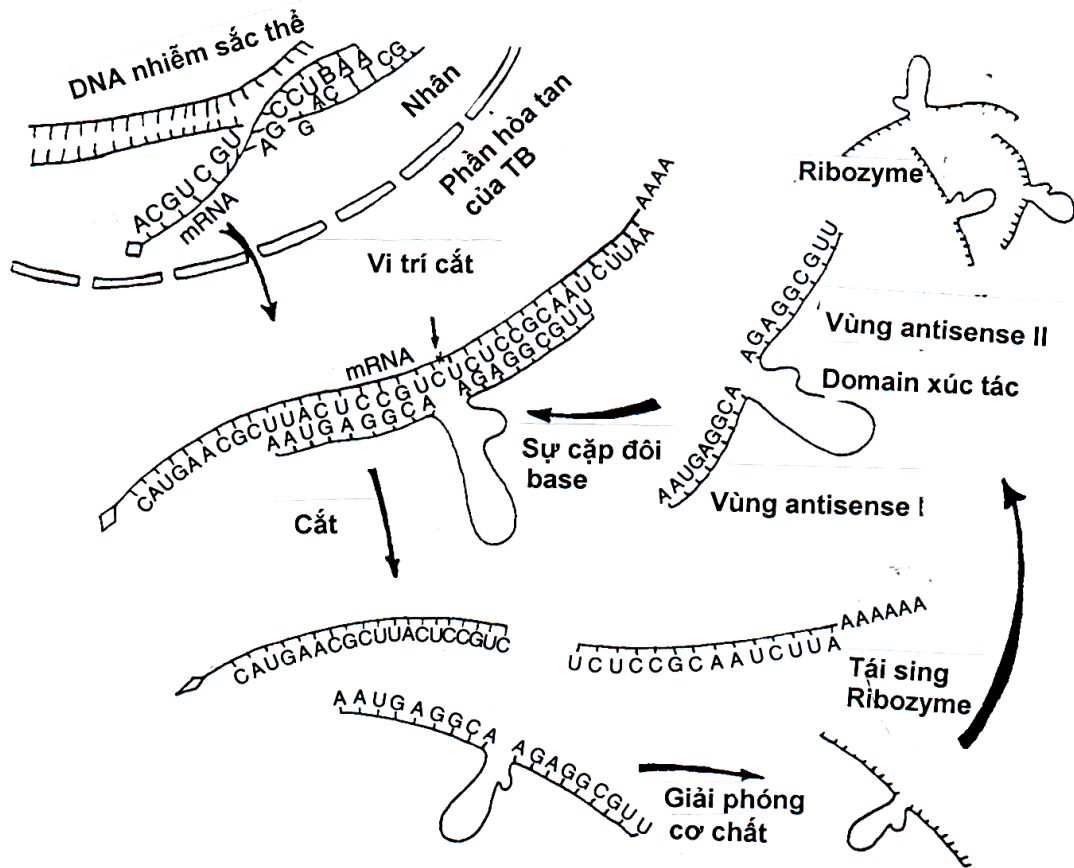
Một chiến lược khác lại sử dụng ribozyme để ngăn chặn sự sao chép của virus hoặc phiên mã gen virus. Ribozyme là các phân tử RNA có một bán phần xúc tác có khả năng phân cắt các phân tử RNA đích xung quanh các cánh tay RNA có khả năng gắn với các trình tự đích bởi các cặp base bổ cứu tương tự antisense oligonucleotide (H16.8). Về lý thuyết thì một ribozyme có thể phân cắt được nhiều phân tử RNA đích. Khi thâm nhiễm một vec tơ có chứa trình tự của một ribozyme thì có thể tạo ra nhiều bản phiên mã phân tử ribozyme trị liệu trong các tế bào đích.

Một chiến lược kháng virus khác lại sử dụng các polypeptide không trội được thiết kế để tương tác với bản phiên mã tự nhiên, vì thế mà ngăn chặn được sự lắp ráp của virus hoặc làm mất chức năng enzyme của chúng.



Hình 16.7 Antisense oligonucleotide. DNA nhiễm sắc thể được phiên mã thành mRNA có chứa mũ 5' và đuôi poly-A ở đầu tận 3'. mRNA ra khỏi nhân rồi vào tương bào, ở đó xảy ra sự phiên dịch thành các protein. Sự phiên dịch được thực hiện bởi các ribosome và đòi hỏi phải có một vị trí gắn ribosome. Antisense oligonucleotide gồm các chuỗi DNA đơn ngắn. Nếu trình tự acid nucleic của gen virus đã được biết thì chúng có thể được thiết kế để gắn với mRNA virus bởi các cặp base bổ cứu. Kết quả này đã làm ức chế trực tiếp sự phiên dịch hoặc phân cắt các thành phần RNA của phân tử

lai RNA-DNA bởi RNase H. Sự sao chép của các virus viêm gan B và C phụ thuộc vào một trung gian RNA, vì thế antisense oligonucleotide có thể can thiệp vào sự sao chép của virus.
(Theo Christy L. Schilling, Martin J. Schuster và George Wu. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)



Hình 16.8 Các Ribozyme. DNA nhiễm sắc thể được phiên mã thành mRNA có một mũ ở đầu 5' và một đuôi poly-A ở đầu tận 3'. mRNA ra khỏi nhân và tới tương bào ở đây diễn ra sự tổng hợp protein. Ribozyme là các phân tử RNA có bản phần xúc tác có khả năng phân cắt các phân tử RNA đích. Domain xúc tác xung quanh hai cánh tay của RNA được thiết kế như các vùng antisense. Các vùng antisense được thiết kế để gắn trình tự đích bởi các cặp base bổ cứu. Sau khi phân cắt, cơ chất được giải phóng và ribozyme lại quay vòng để cắt các phân tử đích khác. Các ribozyme có thể phân cắt các phân tử mRNA cũng như RNA virus có liên quan tới sự sao chép của virus.
(Theo Christy L. Schilling, Martin J. Schuster và George Wu. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

16.5.1 Bệnh viêm gan virus mạn

Có ít nhất 5 virus khác nhau gây viêm gan trên người. Virus gây viêm gan A và virus gây viêm gan E được truyền chủ yếu qua đường uống và có thể tự giới hạn được. Còn 3 virus khác đã biết rất rõ về các đặc tính, đó là virus gây viêm gan B (HBV), virus gây viêm gan C (HCV) và virus gây viêm gan D (HDV). Những virus này thâm nhiễm dai dẳng và gây bệnh viêm gan mạn.

16.5.2 Virus gây viêm gan B

Virus gây viêm gan B (hepatitis B virus – HBV) là một virus DNA nhỏ có phân tử DNA chuỗi kép đóng một phần với khoảng 3200 cặp base. HBV thuộc nhóm virus DNA hướng gan (hepadnavirus) bao gồm virus viêm gan của sóc đen, sóc đất, vịt Pekin và diệc. Virus này có lớp vỏ bên ngoài và một lõi bên trong (nucleocapsid). Vỏ là cấu thành chính của KN bề mặt virus viêm gan B (hepatitis B surface antigene –HBsAg). Phần nucleocapsid có chứa kháng nguyên lõi viêm gan (hepatitis core antigene –HBcAg), enzyme phiên mã ngược/DNA polymerase và hệ gen virus. Khác với tất cả các virus DNA của động vật có vú đã biết khác, sự sao chép của hepadnavirus lại thông qua sự phiên mã ngược của một trung gian RNA nội sinh trong chu kỳ sống của retrovirus RNA (HIV). Dựa trên các bước cơ bản này trong sự sao chép của virus mà người ta đưa ra một chiến lược kháng virus nhằm vào quá trình phiên mã ngược của RNA HIV hoặc enzyme phiên mã ngược của HIV, có thể đó là một tiềm năng lớn kháng lại sự thâm nhiễm HBV. Có nhiều trình tự antisense có khả năng ức chế sự sao chép của các virus viêm gan B và C *in vitro* đã được xác định. Người ta cũng quan sát thấy hiệu ứng trên DNA phosphorothioate của antisense *in vivo*. Tuy nhiên, vì oligonucleotide nói chung được các tế bào hấp thu tương đối thấp nên dễ bị phân giải trong huyết tương và người ta hy vọng các chiến lược với antisense sẽ được sử dụng trong việc trị liệu virus viêm gan *in vivo*. Một hệ thống cơ sở cộng hợp asialoglycoprotein-poly-L-lysine sẽ được sử dụng để chuẩn bị các phức hợp ASOR-PL với một antisense oligonucleotide 21-mer bổ cứu cho trình tự tín hiệu polyadenylate hóa hệ gen HBV. Bằng việc sử dụng các mẫu có hoạt tính phóng xạ và đánh dấu đuôi, người ta đã xác định được rằng các oligo đơn chỉ được hấp thu với tốc độ 0,05 pmol/giờ/một triệu tế bào bởi 2 dòng tế bào u gan HepG₂ (AGPr dương tính) hoặc SK Hep1 (ASGPr âm tính). Tuy nhiên, sự hấp thu của oligo cộng hợp với ASOR-PL lại nhanh hơn 10 lần ở các tế bào HepG₂, nhưng không thấy có sự thay đổi gì ở các tế bào SK Hep1. Nếu cho ủ với một lượng thừa asialoorosomucoid thì lại ngăn chặn sự hấp thu. Để xem các antisense đích có hoạt tính kháng virus hay không, người ta đã sử dụng các dòng tế bào Hep G2.2.2.15. Dòng tế bào này có ASGPr đã tải nạp ổn định với hệ gen HBV toàn phần có chứa các KN virus cũng như các hạt virus thâm nhiễm. Việc phân phối DNA antisense phức hợp đã ngăn chặn sự biểu hiện của HBsAg trong những tế bào này và làm giảm sự sao chép của DNA virus khoảng 80% so với đối chứng không được xử lý. Một oligonucleotide phức hợp với một trình tự ngẫu nhiên thì không có hiệu ứng và chỉ riêng DNA antisense oligo thì lại làm giảm sự biểu hiện KN bề mặt và sự sao chép của virus chỉ xấp xỉ 30%.

Một nghiên cứu kế tiếp, ASOR-PL được phức hợp với antisense oligonucleotide 21-mer phosphorothioate kháng lại vùng polyadenylate và các trình tự ngược liên kế của WHV đã được sử dụng để điều trị cho những sóc đen thâm nhiễm WHV. Những động vật này được tiêm vào tĩnh mạch phức hợp ASOR-PL chứa 0,4 mg antisense trong 5 ngày liên tiếp (liều tổng cộng là 2mg/động vật /ngày). Mặc dầu không thấy có sự khác biệt về mức KN bề mặt giữa động vật được xử lý và không được xử lý, nhưng những gánh nặng về virus

thì đã được giảm nhẹ đáng kể. Những động vật được xử lý sau 25 ngày đã giảm DNA virus trong tuần hoàn. Quá trình này kéo dài khoảng 2 tuần, sau đó DNA virus sẽ tăng dần trở lại. Antisense đơn hoặc một phức hợp chứa DNA oligo ngẫu nhiên có cùng kích cỡ và cách liên kết nhưng lại không có bất kỳ hiệu ứng nào đối với mức DNA virus.

Để điều trị dự phòng đích các tế bào gan, các antisense oligonucleotide trên được phức hợp với ASOR-PL để phòng ngừa sự thâm nhiễm tiếp theo với HBV. Thường không thể đoán trước được khi nào sẽ xảy ra sự biểu hiện cấp của HBV. Tuy nhiên, sau khi ghép gan cho các bệnh nhân nhiễm HBV thì vẫn có thể bị tái thâm nhiễm và trong hầu hết các trường hợp đều có xu hướng tăng tốc. Tuy nhiên, việc bảo vệ tổ chức ghép bằng điều trị dự phòng có thể tránh được sự tái thâm nhiễm. Điều trị dự phòng các tế bào Huh 7 (AGPr dương tính) với phức hợp antisense – ASOR-PL trước khi lipofectin với plasmid HBV (6,5 triệu bản phiên mã plasmid /tế bào) đã ức chế sự tổng hợp mới DNA virus gắn lõi ở các tế bào Huh 7 xuống dưới mức có thể phát hiện được hoặc ít hơn 0,1 pg khi đánh giá bằng PCR định lượng. HBsAg được các tế bào tiết vào môi trường, nó bị ức chế bởi chính liều lượng tiết ra với mức tối đa là 97% và sự ức chế được kéo dài 6 ngày. Điều trị dự phòng với antisense cộng hợp hay phức hợp với oligo ngẫu nhiên thì không có hiệu ứng. Mới gần đây, một thiết bị đích bao gồm các hạt adenovirus của người cộng hợp với albumin huyết thanh bò cải biến với N-acetyl-glucosamine, streptavidin và PL đã được sử dụng để chuyển giao antisense oligonucleotide 16-mer cải biến với phosphorothioate tới gan thông qua AsGPr. Oligonucleotide kháng trực tiếp tín hiệu bọc nang của gen lõi. Các tế bào u gan của gà (chicken hepatoma cells –LHM) được thâm chuyển bởi phức hợp HBV-DNA. Khi các tế bào được xử lý với oligonucleotide ở thời điểm trước và sau khi xử lý với phức HBV-DNA thì ức chế khoảng 80% mức HBV-DNA gắn hạt lõi.

Một chiến lược kháng virus khác lại sử dụng các polypeptide không trội, nó được thiết kế để tương tác với các bản phiên mã tự nhiên của chúng, vì thế mà ngăn chặn được sự lắp ráp của virus hay gây tác động tới chức năng enzyme của chúng. Những thể đột biến của protein lõi HBV rõ ràng là ức chế sự sao chép của các virus hoang dã vì nó can thiệp vào quá trình hình thành nucleocapsid.

16.5.3 Virus gây viêm gan C

Virus viêm gan C (hepatitis C virus –HCV) có hệ gen RNA chuỗi đơn dài khoảng 9500bp. Sự sao chép của nó đòi hỏi một trung gian RNA tích điện âm được tổng hợp bởi RNA polymerase phụ thuộc RNA virus. Hệ gen virus mã cho một polyprotein đơn có chiều dài 3010-3033 amino acid. Hệ quả của các quá trình sau phiên dịch là RNA gắn với protein nucleocapsid C, protein vỏ E1 và E2 và các protein không cấu trúc từ NS1 đến NS5, bao gồm cả RNA polymerase phụ thuộc RNA. Ở cả 2 đầu tận của hệ gen RNA đều có các trình tự bảo tồn gọi là vùng không được mã hóa (noncoding regions –NCR) có liên quan với việc sao chép RNA, khởi đầu phiên dịch và có thể cả sự đóng gói RNA.

Hiện nay, các mô hình động vật mới chỉ giới hạn ở tinh tinh. Vì lý do này mà trong các nghiên cứu *in vitro* người ta đã dùng các cấu trúc nghiên cứu thông thường để tìm ra cách điều trị mới với GTL viêm gan virus C. Trong các nghiên cứu trước đây, cDNA virus viêm gan C đã được phân dòng và được dùng để quét tìm các vùng bảo tồn cao của hệ gen virus viêm gan để tìm các trình tự đích tiềm tàng theo cách tiếp cận antisense. Sau khi phiên mã với T7 RNA polymerase, RNA của HCV được làm tinh khiết và trộn dư 10 lần mole với antisense hoặc antisense oligonucleotide. Những hỗn hợp này được sử dụng

trong phân tích *in vitro* dịch thủy phân hồng cầu lưới với sự có mặt của ^{35}S -methionine trong tổng hợp protein của HCV. Các oligonucleotide có nghĩa thể hiện không có hiệu ứng ức chế đáng kể sự tổng hợp protein HCV khi đo bằng sự hợp nhất của ^{35}S -methionine. Ngược lại, một antisense oligonucleotide lại kháng trực tiếp 5'NCR nên đã ức chế sự phiên dịch *in vitro* trên 50%. Một antisense oligonucleotide khác lại kháng trực tiếp mã khởi động gen lõi HCV nên đã ức chế sự phiên dịch *in vitro* tới 97%. Điều lý thú là, nếu antisense oligonucleotide kháng trực tiếp các trình tự xa hơn nữa thì lại không có hiệu ứng ức chế sự phiên dịch, có lẽ do ngăn chặn không hiệu quả sự chuyển vị của ribosome khi phiên dịch. Đáng lưu ý là tỷ lệ phân tử của oligonucleotide với RNA HCV là 10/1 thì mới có hiệu ứng.

Trong các nghiên cứu kế tiếp, người ta xét tới cả khả năng của các antisense oligonucleotide đối với việc ức chế phiên dịch trong nuôi cấy tế bào. Các dòng tế bào u gan người được thâm chuyển với các plasmid có các vùng đích HCV bảo tồn ở dưới promoter hay ở trên gen nghiên cứu luciferase. Có 4 antisense oligonucleotide khác nhau kháng trực tiếp 5'NCR được đồng thâm chuyển với cấu trúc nghiên cứu. Ở nồng độ 0,3 μM ($\sim 3\mu\text{g}$ /đĩa nuôi cấy tế bào 35mm) có 2 đĩa có hiệu ứng ức chế 95% hoạt tính luciferase. Điều lưu ý quan trọng là oligonucleotide có nghĩa này còn ức chế cả sự biểu hiện luciferase tới 30%.

Các ribozyme cũng thể hiện hiệu ứng kháng RNA virus viêm gan B và C. Cho tới nay, các thí nghiệm sử dụng kỹ thuật ribozyme đã chứng minh được rằng nó phân cắt được RNA của HBV *in vitro*, nhưng không kiểm chế được sự sao chép của HBV hoặc sự phiên dịch (tổng hợp) protein HBV trong các hệ thống tế bào hoặc *in vivo*.

Đối với HCV, việc kiểm chế biểu hiện gen virus trong các tế bào bởi ribozyme được chứng minh là đã thành công. Một plasmid mang gen nghiên cứu HCV-luciferase đã được thiết lập với 5'NCR và phần gen lõi nằm giữa promoter CMV và gen luciferase. Ngoài ra còn 4 vec tơ mang các trình tự của ribozyme hammerhead kháng trực tiếp 5'NCR hoặc vùng lõi cũng được sử dụng để tổng hợp các phân tử ribozyme cho các nghiên cứu *in vitro*. Sau phiên mã *in vitro* của HCV-luciferase RNA, các phân tử ribozyme khác sẽ được khảo sát về hoạt tính phân cắt của chúng. Dòng tế bào u gan người Huh 7 sau đó được sử dụng để khảo sát hoạt tính *in vivo*. Các tế bào sẽ được đồng thâm chuyển với ribozyme RNA và HCV-luciferase RNA với tỷ lệ mole là 0:1; 3:1; 10:1; 30:1, tỷ lệ thứ nhất được xem như là đối chứng. Hai ribozyme kháng trực tiếp 5'NCR và vùng lõi, kiểm chế hoạt tính luciferase tới 73% (tỷ lệ ribozyme/gen nghiên cứu là 10:1) và 55% (tỷ lệ 30:1). Các thí nghiệm đối chứng với các ribozyme có đột biến ở vùng xúc tác thì không thấy bất kỳ hiệu ứng ức chế nào với cùng tỷ lệ mole. Khi đồng thâm chuyển plasmid HCV và các vec tơ biểu hiện các tế bào nhân thực mã cho ribozyme hứa hẹn nhất với dư 20 lần mole vec tơ ribozyme đã kiểm chế được hoạt tính của luciferase khoảng 50 và 40%. Các thí nghiệm đối chứng với các ribozyme không kháng trực tiếp HCV hoặc đồng thâm chuyển một vec tơ mang gen luciferase nhưng không hướng tới trình tự HCV thì sẽ chứng minh được tính đặc hiệu của hiệu ứng này. Cuối cùng, người ta khảo sát thấy các dòng tế bào đã sản xuất được 2 ribozyme. Các tế bào biểu hiện ribozyme được thâm chuyển tức thì với plasmid nghiên cứu HCV-luciferase ức chế được 30-50% hoạt tính luciferase khi so sánh với các tế bào cha mẹ được thâm chuyển tức thì với cấu trúc nghiên cứu. Trong một nghiên cứu truyền thống nếu plasmid luciferase được thâm chuyển tức thời, các dòng tế bào sẽ biểu hiện ribozyme và không thấy có sự khác biệt về hoạt tính của luciferase ở các tế bào bố mẹ.

16.6 Ung thư tế bào gan

Ung thư tế bào gan (hepatocellular carcinoma – HCC) là một bệnh ác tính thông thường nhất, hàng năm có hàng triệu người chết vì bệnh này. Yếu tố gây rủi ro chính được xác định là thâm nhiễm mạn virus viêm gan B và C, xơ gan, và đặc biệt là do sự lạm dụng rượu hoặc bệnh nhiễm sắc tố sắt mô (hemochromatosis) và độc tố của aflatoxyn. Với HCC chỉ có một chỉ định là phẫu thuật. Tuy nhiên với các bệnh nhân ở thời điểm được chẩn đoán khối u đã lan rộng và kết hợp cả xơ gan thì không thể phẫu thuật được. Các nghiên cứu tìm kiếm các cách điều trị mới cũng chưa thu được kết quả đáng kể.

So với các bệnh đã đề cập ở trên thì GTL với HCC còn phải đối mặt với nhiều thách thức. Chẳng hạn như, các khối u rất đa dạng và một khối u ác tính đơn cũng không chỉ có một quần thể đồng hợp tử của các tế bào. Các tế bào khối u có thể có sự khác nhau về receptor bề mặt cũng như sự lưu chuyển của tế bào. Các khối u đặc có chứa các tế bào đang phân chia nhanh cũng như các tế bào nằm yên. Có thể điều khó khăn nhất là nhiều HCC lại là đa bào hoặc đã di căn ở thời điểm được chẩn đoán. Lúc này đòi hỏi phải có một cách điều trị có tính hệ thống. Cho tới nay các thử nghiệm GTL với HCC đã được nghiên cứu trên mô hình động vật và chưa đi đến các thử nghiệm lâm sàng.

Hiện nay, hầu hết các nghiên cứu về GTL ung thư tế bào gan đều nhằm làm tăng tính sinh miễn dịch với các khối u. Điều này có thể được thực hiện bằng việc chuyển một gen mã cho một KN mới vào trong các tế bào khối u hoặc bằng cách khuếch đại hay làm bùng nổ ĐUMD kháng lại các tế bào ác tính thông qua việc đưa vào các gen mã cho một cytokine. Cuối cùng là dùng một gen “tự sát” (suicide gene) trong đó có một gen mã cho một enzyme được đưa vào các tế bào khối u để chuyển đổi một tiền thuốc vô hại thành một tác nhân gây độc tế bào với khối u làm cho khối u nhạy cảm với các tiền thuốc.

Một trong các nghiên cứu đầu tiên là thiết kế các retrovirus tái tổ hợp mang gen thymidine kinase của virus thủy đậu (varicell-zoster virus thymidine kinase – *VZV-tk*), điều hòa phiên mã bởi β -fetoprotein hoặc bởi các trình tự promoter albumin liên quan u gan.

Các tế bào biểu hiện *VZV-tk* sẽ trở nên nhạy cảm chọn lọc với việc chuyển tiền thuốc vô hại araM thành ara ATP độc tế bào, tạo nên hiệu ứng độc tế bào đặc hiệu.

Cùng với promoter β -fetoprotein thì sự biểu hiện của *VZV-tk* sẽ chỉ xảy ra ở các tế bào HCC sản xuất β -fetoprotein chứ không phải ở các tế bào gan bình thường âm tính với β -fetoprotein (hình 16.9).

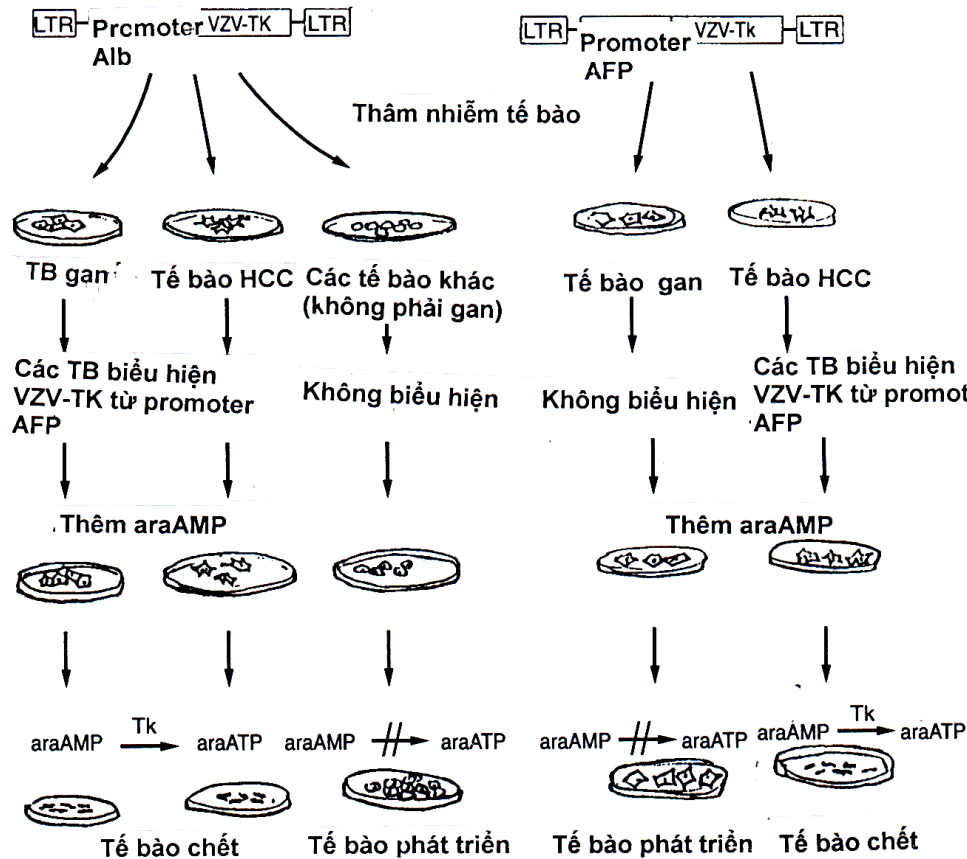
Trong các nghiên cứu sau này, các tế bào HCC được tải nạp nhờ vec tơ adenovirus có chứa gen thymidine kinase của virus herpes simplex (herpes simplex thymidine kinase – *HSV-tk*) sẽ đưa tế bào nhạy cảm lại với tiền thuốc ganciclovir, thuốc này được chuyển đổi bởi thymidine kinase thành dạng triphosphate có độc tính. Sau khi ghép các tế bào khối u đã được tải nạp gen vào chuột nude thì có thể làm thoái lui hoàn toàn các khối u này bằng ganciclovir. Điều này có thể được chứng minh bằng việc tiêm trực tiếp vec tơ adenovirus vào trong các khối u mới hình thành thì sẽ kháng được khối u. Hơn nữa gen *HSV-tk* lại đặt dưới sự kiểm soát của promoter β -fetoprotein nên chỉ các khối u biểu hiện β -fetoprotein thì mới có thể điều trị đạt kết quả, nhưng thực tế lại có một số tế bào khác cũng “chịu lửa” cùng. Điều này cho thấy chỉ cần tải nạp một số nhỏ tế bào khối u cũng đã làm thoái lui hoàn toàn khối u. Giải thích về vấn đề này người ta gọi là hiệu ứng “người ngoài cuộc” (bystander) rất giống cơ chế miễn dịch học trong các tế bào khối u đã tải nạp hoặc do sự giải phóng triphosphate gây độc tế bào ở các khoảng không ngoại bào. Một cách tiếp cận

khác lại dùng một vec tơ retrovirus biểu hiện gen TNF- α để tải nạp các tế bào ung thư gan,

Việc sử dụng albumin hoặc yếu tố điều hòa α -fetoprotein đã có kết quả ở tế bào gan hoặc biểu hiện được gen đặc hiệu tế bào HCC. Sự thâm nhiễm hay biểu hiện của TNF- α không gây bất kỳ hiệu ứng độc tế bào nào đối với sự tăng sinh hay khả năng sống của các tế bào *in vitro* khi so sánh với các tế bào cha mẹ chưa có cải biến.

Vec tơ retrovirus có chứa VZV-TK dưới sự kiểm soát của promoter albumin

Vec tơ retrovirus có chứa VZV-TK dưới sự kiểm soát của promoter AFP



Hình 16.9 Cách tiếp cận của gen tự sát. Các retrovirus tái tổ hợp được thiết lập có mang gen thymidine kinase của virus thủy đậu (VZV-tk) dưới sự kiểm soát của albumin (alb, bên trái) hoặc α -fetoprotein (bên phải). Các tế bào gan hoặc các tế bào HCC thì biểu hiện albumin, vì vậy VZV-tk sẽ biểu hiện promoter albumin (bên trái). Các tế bào HCC biểu hiện α -fetoprotein và vì vậy sự biểu hiện của VZV-tk là từ promoter của α -fetoprotein (phía phải). Các tế bào biểu hiện VZV-tk trở nên nhạy cảm chọn lọc với tiền thuốc araM vô hại và nó sẽ được chuyển đổi thành araATP độc tế bào bởi VZV-tk.

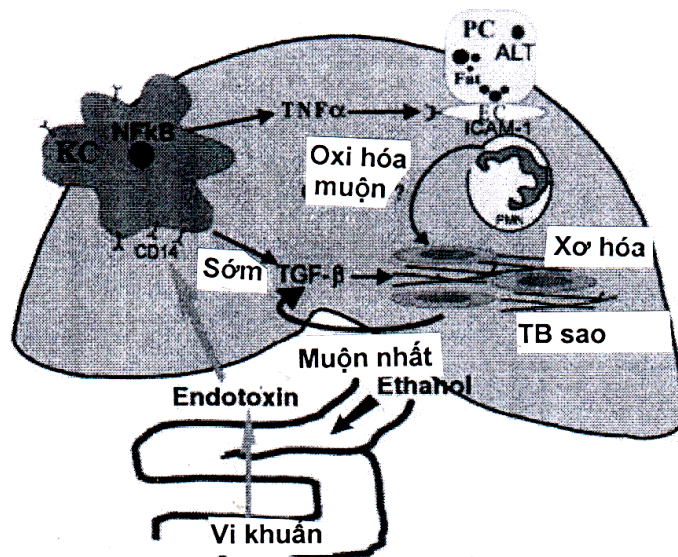
(Theo Christy L. Schilling, Martin J. Schuster và George Wu. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Điều này là sự thật cả với các vec tơ retrovirus mã cho TNF- α cũng như vec tơ retrovirus đối chứng chỉ chứa gen kháng neomycine. Sau khi tiêm dưới da các tế bào HCC đã tải nạp

vào chuột thì chỉ 1/20 con phát triển khối u và tỷ lệ là 10/10 và 8/10 ở chuột được tiêm các tế bào HCC bố mẹ hoặc các tế bào HCC thâm nhiễm vec tơ đối chứng. Một nhóm gồm 19 động vật trước kia chưa hề phát triển khối u, sau khi tiêm các tế bào HCC tải nạp TNF- α thì kháng lại phần nào với các tế bào khối u cha mẹ. Điều này được chứng minh bằng việc tiêm lặp lại với cùng một lượng tế bào HCC cha mẹ ở vùng lân cận với vị trí tiêm trước thì chỉ có 4 trong số 19 động vật phát triển khối u dưới da. Tuy nhiên, vẫn chưa có sự nhất trí về sự liên quan với các cơ chế miễn dịch học. Mặt khác, phương pháp này chỉ thể hiện hiệu ứng trên chuột nude và vì thế nó độc lập với chức năng của các lympho T nguyên vẹn. Mối liên quan với đại thực bào cũng như các tế bào lympho T đã được chứng minh bằng các phân tích tổ chức miễn dịch. Tuy nhiên, vẫn chưa rõ cơ chế nào của đáp ứng vật chủ là đặc trưng đối với sự thải loại hoặc phát triển các tế bào tải nạp. Đó là lý do để khẳng định rằng việc sản xuất cục bộ TNF- α đã cảm ứng các cơ chế miễn dịch học gián tiếp dẫn đến thải loại các tế bào khối u cha mẹ và nó sẽ là mối quan tâm lớn nếu có cùng hiệu ứng khi các động vật được tái thách thức với các tế bào khối u ở vị trí xa. Trái ngược với các mô hình khối u đang được áp dụng, trong lâm sàng người ta thường hướng vào việc điều trị một khối u đã được thiết lập. Nhắm vào vấn đề này, các thí nghiệm xa nữa đã được thực hiện nhằm chứng minh các tế bào HCC tải nạp TNF- α có thể ngăn ngừa phát triển khối u của các tế bào HCC chưa được cải biến được ghép từ trước. Tất cả động vật có các tế bào chưa cải biến hoặc các tế bào được thâm nhiễm với vec tơ đối chứng ở lần tiêm thứ hai đều phát triển các khối u, nhưng chỉ 6/20 chuột đã được nhận các tế bào HCC tải nạp TNF- α là phát triển khối u ở vị trí tiêm trước. Hầu hết các HCC là đa bào hoặc đã di căn ở thời điểm chẩn đoán, do đó đòi hỏi phải được điều trị một cách hệ thống. Giới hạn chính của nhiều thử nghiệm GTL với ung thư là thiếu hiệu ứng hệ thống. Tất nhiên mọi điều vẫn đang chờ đợi ở các nghiên cứu đương đại muốn làm thoái lui các khối u trong gan bằng cách chuyển qua mạch máu các tế bào sản xuất retrovirus mã cho interleukin-2 hoặc interleukin-4 (tiêm trong lách), có như thế mới chứng minh được hiệu quả này là sự kháng lại bệnh có tính chất đa bào chứ không phải là bệnh hệ thống.

16.7 Bệnh gan do alcohol

Những cách tiếp cận có tính đổi mới Trong GTL đã cho phép khảo sát y sinh học các bệnh có liên quan tới hành vi mà bệnh gan do alcohol là một ví dụ. Việc sử dụng thường xuyên alcohol ở một số người có thể dẫn tới bệnh gan vì mất chức năng gan. Cho tới nay, việc trị liệu các bệnh gan do alcohol tốt nhất là đình chỉ sử dụng alcohol, còn với các trường hợp bệnh đã ở giai đoạn cuối (hư gan) thì phải ghép gan. Tuy nhiên, ghép gan là một vấn đề khó khăn vì thiếu các tổ chức cho, vì thế phải tìm thêm các phương pháp mới để xử lý. Các nghiên cứu gần đây đã cho chúng ta hiểu sâu hơn về các cơ chế bệnh lý của bệnh gan do alcohol. Các nghiên cứu này đã chỉ rõ 2 chất trung gian độc lập quan trọng cảm ứng sự xơ hóa gan do ethanol (Hình 16.10). Những chất trung gian này là TNF- α và TGF- β và đích của GTL là ngăn ngừa sự xơ hóa gan do sử dụng ethanol.



Hình 16.10 Những cơ chế sinh học do Thurman đề xuất về sự phát sinh bệnh lý học của gan- u gan do alcohol, viêm và xơ gan. Việc sử dụng ethanol đã cảm ứng hội chứng “ruột thủng”, vì thế làm thay đổi tính thấm của ruột đối với các vi khuẩn gram âm ở ruột. Các nội độc tố từ vi khuẩn sẽ tăng lên trong máu và nó cũng sẽ chuyển tới gan. Các nội độc tố ở trong gan sẽ gắn với receptor huyết tương (CD14) của các tế bào Kuffer (đại thực bào của gan). Các tế bào Kuffer giải phóng yếu tố hoại tử khối u ($TNF-\alpha$), yếu tố này điều hòa lên sự biểu hiện của các phân tử kết dính nội bào (intercellular adhesion molecules -ICAM), cảm ứng sự thấm tế bào của các bạch cầu trung tính (neutrophil). Sự hoạt hóa tế bào tiếp theo sẽ cảm ứng $TNF-\alpha$ làm tăng lắng đọng chất nền ngoại bào ở gan (xơ hóa).

(Theo Christy L. Schilling, Martin J. Schuster và George Wu. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Những dữ kiện sớm trong tổn thương gan do alcohol được biểu hiện qua trung gian $TNF-\alpha$, nó được tạo ra bởi các tế bào Kuffer ở gan trong việc đáp ứng với các nội độc tố từ ruột. Các nội độc tố từ ruột có ở gan sẽ làm tăng tính thấm của thành ruột, được gọi là hội chứng “ruột thủng lỗ” (leaky gut) gây nên bởi alcohol. Những nghiên cứu gần đây trên chuột đã tạo được một gen knock-out receptor tế bào với $TNF-\alpha$ và $TNF-R_1$. Những con chuột này được bảo vệ khỏi các bệnh gan do alcohol bất chấp sử dụng alcohol đến mức nào. Vì thế, đích của GTL là ức chế hoặc làm knock-out sự biểu hiện receptor TNF , $TNF-R_1$ hiện đang được khảo sát trong các mô hình động vật về bệnh gan do alcohol. Với cách tiếp cận tương tự, các kỹ thuật antisense cũng được sử dụng để ức chế sự biểu hiện của $TGF-\beta$, một yếu tố tăng trưởng cảm ứng xơ hóa do tăng phân giải các chất nền (matrix) ngoại bào ở gan. Đích ở đây là làm sao cho các tế bào hình sao trong gan tiết ra được một lượng lớn collagen khi được hoạt hóa bởi $TGF-\beta$. Những nghiên cứu gần đây cho thấy các động vật có thể được bảo vệ bằng GTL $TGF-\beta$. Ở đây người ta đã tiêm vào tĩnh mạch của chính receptor không trội với $TGF-\beta$, nhờ vec tơ adenovirus mà ngăn ngừa sự xơ hóa. Vì thế ức chế biểu hiện các chất trung gian gây bệnh là cách tiếp cận quan trọng, có thể ứng dụng được trong GTL bệnh gan.

Chương XVII

ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH TIM MẠCH

17.1 Mở đầu

Sự tăng tiến không ngừng về những hiểu biết trong biến đổi biểu hiện gen liên quan tới các bệnh mắc phải đã tạo nên một viễn cảnh cho sự cách mạng hóa đối với việc tiếp cận lâm sàng các bệnh thông thường. Hiện nay, trên thế giới các bệnh tim mạch tác động tới một quần thể dân cư rộng lớn và cũng là bệnh gây nhiều tử vong nhất. Trong vấn đề này, GTL sẽ cống hiến một tiềm năng làm thay đổi thậm chí đảo ngược lại gốc rễ bệnh lý học của chúng. Khi các nhà nghiên cứu đã hiểu nhiều hơn về di truyền học của bệnh thì phạm vi áp dụng cách trị liệu mới hấp dẫn này sẽ càng được mở rộng.

Thao tác trị liệu các quá trình di truyền bao hàm việc đưa các chất liệu di truyền có chức năng vào trong các tế bào sống cũng như phong tỏa đặc hiệu trình tự của một số gen có hoạt tính xác định. Nhờ hiểu biết tốt hơn về vai trò di truyền đối với bệnh mà các kỹ thuật thao tác gen ngày càng phong phú. Đích trị liệu được xác định là nâng cao hiệu quả các cách trị liệu tim mạch truyền thống như sự tạo mạch của bóng (balloon angioplasty) hay sự cấy ghép. Cách tiếp cận hoàn toàn mới với việc điều trị các bệnh mắc phải là cảm ứng sự tạo mạch trong các mô thiếu máu cục bộ cũng đang phát triển. Nhờ chiến lược thực nghiệm mới này mà người ta nhận thức được rằng điều quan trọng đối với các nhà lâm sàng là phải ý thức được những giới hạn cũng như khả năng của họ để rồi đánh giá một cách cẩn thận, tạo cơ hội cho việc hợp nhất các cách trị liệu này để nó trở thành các thực hành có tính chất thường quy. Nguyên lý cơ bản của thao tác gen và những ứng dụng của nó là điều trị các bệnh tim mạch đã biết cũng như xem xét lại việc áp dụng GTL trong các mô hình trên động vật cũng như các thử nghiệm trên lâm sàng.

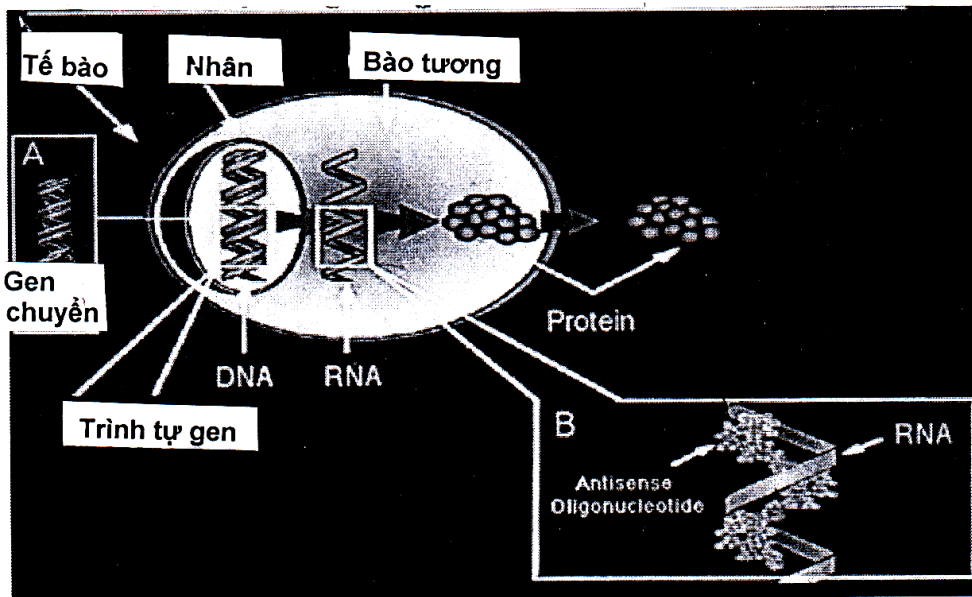
17.2 Thao tác gen đối với mô tim mạch

17.2.1 Sự điều biến biểu hiện gen trong các mô tim mạch

GTL có thể được định nghĩa là bất kỳ thao tác biểu hiện gen nào có gây ảnh hưởng tới bệnh. Thao tác này đạt được kết quả nói chung là thông qua sự thâm chuyển DNA ngoại lai vào trong các tế bào. GTL không những có liên quan tới sự chuyển giao tất cả các gen hoạt hóa (gen chuyển) mà còn có thể phong tỏa sự biểu hiện gen tự nhiên bằng việc thâm chuyển các tế bào với các chuỗi ngắn của acid nucleic như các oligonucleotide (Hình 17.1).

Cách tiếp cận với sự chuyển gen cho phép thay thế các gen đã mất hoặc khiếm khuyết hay làm biểu hiện vượt mức một protein tự nhiên hay ngoại lai. Vì các protein này chỉ có thể được hoạt hóa bên trong tế bào nên trong trường hợp cần phải thay đổi toàn bộ chức năng của một tổ chức hay một mô thì hiệu ứng chuyển gen phải rất cao. Tuy nhiên, các protein được tiết ra bởi các tế bào đích có thể tác động lên các tế bào khác trong phương thức cận tiết (paracrine) hay nội tiết (endocrine), vì thế chỉ cần chuyển được gen tới một tiểu quần thể của các tế bào là đã có được kết quả trị liệu đầy đủ.

Các chiến lược GTL: Chuyển gen nhằm ngăn chặn sự phong tỏa gen



Hình 17.1 Các chiến lược GTL . (A) sự chuyển gen có liên quan với chuyển một gen đầy đủ hoặc bằng thâm nhiễm virus hoặc bằng các vectơ không virus tới nhân của một tế bào đích. Sự biểu hiện của gen thông qua sự phiên mã thành mRNA và dịch mã thành một sản phẩm protein của gen thì sẽ thu được một protein chức năng có hiệu ứng trị liệu trong tế bào tải nạp hoặc được tiết ra để tác động lên các tế bào khác. (B) sự phong tỏa gen liên quan với việc đưa vào trong tế bào các trình tự ngắn của acid nucleic để ngăn chặn sự biểu hiện gen như các antisense ODN gắn với mRNA ở một trình tự đặc biệt và ngăn ngừa sự phiên dịch thành protein.

(Theo Victor J. Dzau, Afshin Ehsan và Micael J. Mann. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Sự phong tỏa gen có thể được thực hiện bằng cách thâm chuyển tế bào với các chuỗi DNA ngắn như các antisense oligonucleotide (ODN). Cách tiếp cận này hướng tới việc làm thay đổi chức năng của tế bào nhờ ức chế biểu hiện gen đặc hiệu. Antisense ODN có một trình tự base là bổ cứu với đoạn gen đích. Trình tự bổ cứu này cho phép gắn đặc hiệu với đoạn tương ứng của mRNA, được phiên mã từ gen này và ngăn chặn sự phiên dịch thành protein.

Một dạng khác của sự phong tỏa gen là dùng các ribozyme – một đoạn RNA có thể tác động giống như các enzyme có thể phân giải các trình tự đặc hiệu của RNA đích. Dạng thứ ba của ức chế gen có liên quan tới việc phong tỏa các yếu tố phiên mã. Các DNA chuỗi kép có thể được thiết kế phỏng theo vị trí gắn các yếu tố phiên mã và tác động như các bẫy để phòng ngừa yếu tố phiên mã từ các gen đích hoạt hóa.

17.2.2 Vec tơ chuyển giao DNA tim mạch

17.2.2.1 Plasmid là các chuỗi DNA vòng, nguyên bản được phát hiện như một phương tiện chuyển gen tự nhiên giữa các vi khuẩn. Các plasmid trần cũng có thể được dùng để chuyển DNA tới các tế bào động vật có vú. Tiêm trực tiếp DNA plasmid vào trong các mô *in vivo* có thể biểu lộ được gen chuyển. Tuy nhiên, sự hấp thu và biểu hiện của plasmid nói chung chỉ mới đạt được mức hợp lý ở cơ xương và cơ tim. Vec tơ chuyển giao DNA tim mạch “lý tưởng” sẽ an toàn và có hiệu ứng chuyển giao cao tới tất cả các dạng tế bào – các tế bào đang tăng sinh cũng như các tế bào nằm yên, với các cơ hội chọn lọc hoặc biểu hiện gen ngắn hạn hay bất định. Vec tơ lý tưởng có khả năng linh hoạt với việc điều tiết các gen với mọi kích cỡ, kiểm soát sự hợp nhất của các mẫu hiện thời và mức độ biểu hiện gen, nhận biết các dạng tế bào đặc biệt cho sự chuyển giao hoặc biểu hiện gen. Mặc dầu đã có những tiến bộ đạt được trên từng mặt riêng lẻ, nhưng GTL cũng còn phải một thời gian nữa mới có được một vec tơ đơn chứa đựng tất cả các đặc tính mong muốn. Mặc dầu phạm vi tác động của các vec tơ đang có những bước tiến triển, nhưng mỗi vec tơ cũng phải tìm ra những khoảng trống riêng trong các chiến lược GTL lâm sàng.

17.2.2.2 Các vec tơ retrovirus không sao chép, tái tổ hợp đã được sử dụng rộng rãi cho việc chuyển gen vào các tế bào tim mạch nuôi cấy *in vitro*, ở đó sự tăng sinh tế bào có thể được thao tác một cách dễ dàng. Tuy nhiên, việc sử dụng vec tơ này *in vivo* có nhiều hạn chế do hiệu ứng tải nạp thấp, đặc biệt với hệ tim mạch- nơi mà hầu hết các tế bào đều ở trạng thái nằm yên. Sự hợp nhất ngẫu nhiên của các vec tơ retrovirus như virus gây bệnh bạch cầu cho chuột moloney (moloney murine leukomia virus –MMLV) vào trong DNA nhiễm sắc thể có liên quan tới hiểm họa tiềm ẩn làm hoạt hóa các gen ung thư và sự tăng trưởng của tế bào tăng sản ung thư. Trong khi đó việc sử dụng các vec tơ virus trong các thử nghiệm lâm sàng thì sự rủi ro phải thấp và độ an toàn cao hơn. Những cải tiến gần đây trong các hệ thống đóng gói (đặc biệt là việc phát triển các vec tơ retrovirus “giả” hợp nhất vào protein G của virus gây bệnh nước ở miệng) đã làm tăng tính ổn định của các hạt retrovirus và tạo thuận lợi cho việc sử dụng chúng với nhiều tế bào đích hơn.

17.2.2.3 Adenovirus tái tổ hợp trở thành vec tơ được sử dụng rộng rãi nhất cho các thí nghiệm chuyển gen cho hệ tim mạch *in vivo*. Adenovirus thâm nhiễm các tế bào không phân chia và nhìn chung là không hợp nhất vào trong hệ gen vật chủ. Những vec tơ này vì thế mà có thể đạt được hiệu quả tương đối cao trong việc chuyển gen vào trong một số dạng tế bào tim mạch yên lặng. Nhưng các gen chuyển nói chung sẽ bị mất đi khi các tế bào được kích thích để đi vào vòng phân chia tế bào. ĐUMD đối với các đại diện KN của adenovirus là hạn chế lớn nhất đối với việc sử dụng chúng cho GTL. Các vec tơ thông thường chỉ biểu hiện gen trong vòng 1-2 tuần lễ sau khi thâm nhiễm. Cũng chưa xác định được sự hủy hoại nào của các tế bào thâm nhiễm đã góp phần vào việc kết thúc biểu hiện gen cũng như kiểm chế sự xuất hiện các promoter gen chuyển của episome. Trong hệ tim mạch, các hàng rào sinh lý như lá đàn hồi trong (internal elastic lamina) rõ ràng đã làm giới hạn sự thâm nhiễm các tế bào nội mô. Với việc chuyển gen tới trung và ngoại mạc thì chỉ xảy ra sau khi các cấu trúc mạch đã hết tổn thương. Mặc dầu sự chuyển gen đạt tới 30-60% tế bào sau khi tổn thương bóng (balloon injury) với các vec tơ adenovirus có mang gen nghiên cứu, nhưng thực tế là các bệnh xơ vữa động mạch vẫn bị giới hạn hiệu ứng do tải nạp với adenovirus. Đó là vấn đề cần phải đặt ra đối với việc điều trị bệnh cho con người.

17.2.2.4 Virus adeno liên hợp (AAV) có thể thâm nhiễm nhiều tế bào đích và có thể thiết lập sự thâm nhiễm tiềm ẩn do có sự hợp nhất vào trong hệ gen tế bào vì thế mà có được sự chuyển gen ổn định như các vec tơ retrovirus. Mặc dầu các vec tơ AAV tải nạp các tế bào đang sao chép với tốc độ nhanh hơn, nhưng khả năng thâm nhiễm với các tế bào không sao chép lại phải được thực hiện cả *in vitro* và *in vivo*. Tuy nhiên, cũng cần phải xác định hiệu ứng của sự chuyển gen qua trung gian AAV tới các tế bào mạch máu và khả năng tiềm ẩn của việc sử dụng các vec tơ AAV *in vivo* trong GTL các mạch máu. Nhưng cũng có nhiều nghiên cứu thành công trong việc tải nạp với các tế bào cơ tim sau khi tiêm trực tiếp nhũ dịch AAV vào trong mô tim, và sự thâm nhiễm này đã làm biểu hiện tương đối ổn định trên 60 ngày.

Đối với việc phát triển các phương pháp thâm chuyển hiệu lực *in vivo* những chất liệu không phải virus vào các mô tim mạch thì vẫn còn nhiều thách thức đối với các nhà nghiên cứu lâm sàng. Các phương pháp chuyển gen với cơ sở lipid thì việc chuẩn bị dễ dàng và linh hoạt hơn. Các liposome cationic đã được phát triển và sử dụng rộng rãi *in vivo* và *in vitro* từ 5-10 năm trước đây trong việc chuyển DNA plasmid và các antisense oligonucleotide. Các chất khác như lipopolyamine và các polypeptide cationic cũng đang được xem xét như các phương tiện vận chuyển tiềm năng nhằm nâng cao sự chuyển giao DNA cả trong các chiến lược chuyển gen cũng như phong tỏa gen. Tuy nhiên, hiệu ứng chuyển giao DNA *in vivo* với bất kỳ phương pháp nào đi nữa thì vẫn còn rất thấp. Việc cho thêm vào các hạt virus Sendai bất hoạt cho các chế phẩm liposome đã nâng cao các đặc tính fusogenic của các lipid và có thể là một phương tiện nhằm tăng cường sự chuyển giao DNA. Hơn nữa, khi áp dụng nó lại được đặt dưới sự kiểm soát môi trường điều hòa làm cho mô mạch máu không căng phồng nên đã làm tăng sự hấp thu oligonucleotide và sự định vị nhân. Phương pháp này có thể đặc biệt hữu ích với *ex vivo* như ghép hay cấy ghép tĩnh mạch và nó cũng có thể đại diện cho một phương thức làm tăng cường sự chuyển gen của plasmid.

17.2.3 Kiểm soát sự biểu hiện gen trong mô tim mạch

Ngoài việc chuyển gen một cách hiệu quả, nhiều phương thức trị liệu vẫn đòi hỏi sự kiểm soát về thời gian kéo dài, sự định vị và mức độ biểu hiện gen chuyển. Để đi tới kết quả, các nhà nghiên cứu đã phát triển sớm các hệ thống promoter gen cho phép các nhà lâm sàng điều tiết được cả thời gian và không gian sự biểu hiện gen. Hệ thống này bao gồm các promoter đặc hiệu mô phân lập từ các trình tự gen mã cho các protein, giới hạn tự nhiên đối với mô đích như promoter yếu tố Willebrand cũng được phân lập từ các hệ thống không phải động vật có vú, nó có thể thúc đẩy hay ức chế sự biểu hiện gen với sự có mặt của các yếu tố được lý như tetracycline, kẽm hoặc các steroid. Ngoài sự điều hòa biểu hiện gen, có thể vẫn phải hạ thấp các điều kiện sinh lý học để hợp nhất được các promoter, các yếu tố tăng cường hoặc các yếu tố điều hòa khác nhằm đáp ứng với các giai đoạn phát triển hoặc các điều kiện đặc biệt như giảm lượng không khí đi vào hoặc tăng stress oxy hóa.

17.3 Gen trị liệu hẹp van tim tái phát

17.3.1 Sinh lý bệnh học của hẹp van tim tái phát

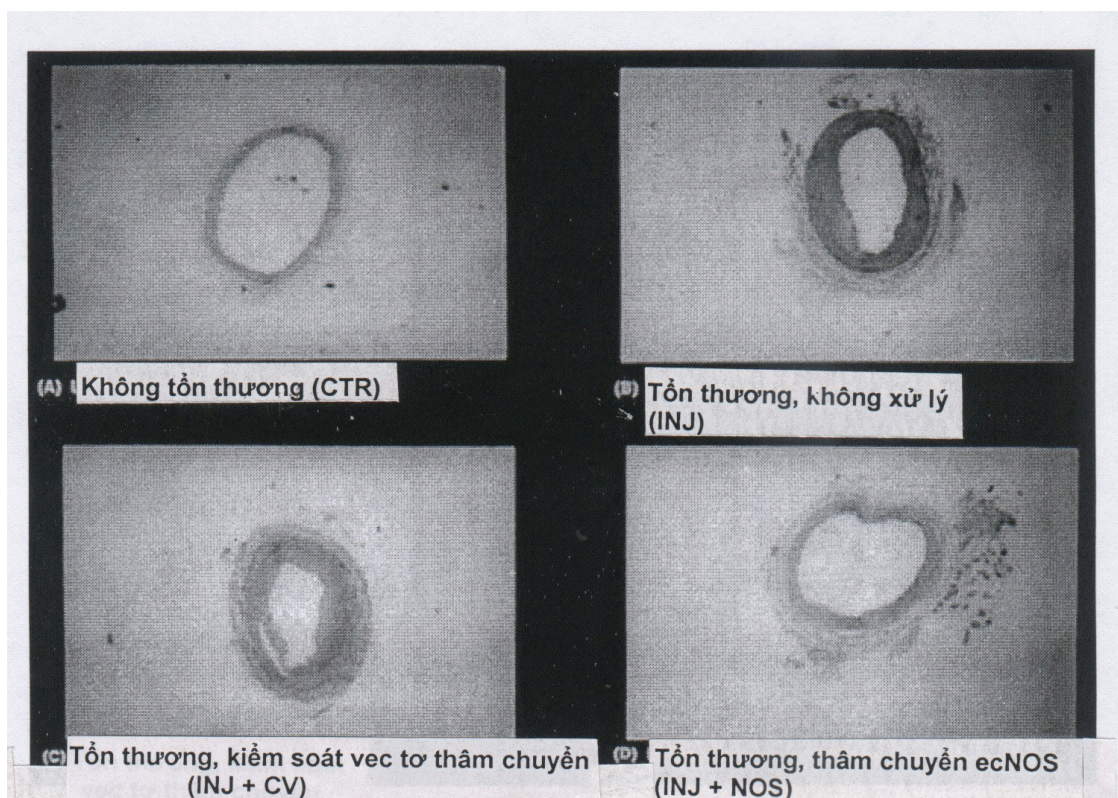
Sự thu hẹp định kỳ của các động mạch là kết quả của sự tạo mạch dưới da, xơ vữa động mạch hoặc do các kỹ thuật khai thông khác - đó là các vấn đề lâm sàng thương gặp. Chính vì thế mà các quy trình kỹ thuật với các bệnh nhân mà động mạch bị bịt kín do xơ vữa bị hạn chế một cách ghê gớm. Trong trường hợp tạo mạch đến mức làm căng phồng thì 30-40% tái phát hẹp van tim là do xử lý tổn thương mạch vành và 30-50% là do tổn thương động mạch mặt trước đùi trong năm thứ nhất. Các ống dẫn nội mạch cũng làm giảm tỷ lệ tái phát hẹp van tim trong một số bối cảnh. Tuy nhiên, vẫn còn rất nhiều biến cố và các số liệu về tác dụng dài hạn của nó còn rất hạn chế. Mặc dầu các tiến bộ kỹ thuật nội mạch xử lý các tổn thương động mạch là đầy ấn tượng, nhưng muốn có được lợi ích toàn diện thì vẫn phải chờ đợi vào một giải pháp sinh học cơ bản.

Sinh lý bệnh học của sự tái phát hẹp van tim bao gồm sự co thắt và xơ hóa thành mạch, là do sự tổ chức lại (remodeling) và sự phát triển mạnh các thương tổn do xơ hóa tế bào, chủ yếu là các tế bào cơ trơn của mạch máu (vascular smooth muscle cells -VSMC) và các chất nền ngoại bào. Quá trình sau được hiểu như là sự tăng trưởng tân nội mạc (neointimal hyperplasia) có liên quan tới việc kích thích VSMC “yên lặng” bình thường trong động mạch để chuyển thành dạng hoạt hóa mà đặc trưng bởi sự tăng sinh và di chuyển nhanh. Có nhiều yếu tố tăng trưởng giữ vai trò quan trọng trong việc kích thích VSMC trong khi tăng trưởng tân nội mạc, bao gồm yếu tố tăng trưởng từ tiểu cầu (platelet-derived growth factor -PDGF), yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi cơ bản (basic fibroblast growth factor -bFGF), yếu tố tăng trưởng biến nạp β (transforming growth factor β -TGF- β) và angiotensin II. Các VSMC hoạt hóa cũng sản sinh ra nhiều enzyme, cytokine, các phân tử kết dính và các protein khác, nó chẳng những làm tăng đáp ứng viêm trong thành mạch mà còn kích thích cả các tế bào mạch máu bình thường. Mặc dầu vậy, hiện tại người ta cho rằng sự sửa đổi lại (chủ yếu do mất lòng ống - lumen) sau khi làm giãn rộng các mạch bị xơ vữa, và sự tăng sinh là đích nổi trội cho các can thiệp gen thực nghiệm.

17.3.2 Các cách tiếp cận để kìm tế bào và gây độc tế bào

Có 2 cách tiếp cận chính: kìm tế bào và gây độc tế bào. Kìm tế bào là các tế bào được ngăn ngừa khỏi tiến trình phân bào có tư của chu trình tế bào. Độc tế bào là các tế bào bị chết do cảm ứng. Một nhóm các phân tử được hiểu là các protein điều hòa chu trình tế bào tại các thời điểm khác nhau dọc theo chu kỳ tế bào. Điều này được dựa trên giả thuyết cho rằng nếu ngăn chặn sự biểu hiện gen đối với một hoặc nhiều sản phẩm gen điều hòa thì sự tiến triển của VSMC thông qua chu kỳ tế bào sẽ được ngăn chặn cũng như ức chế được sự tăng trưởng tân nội mạc sau tổn thương động mạch cảnh, đó là những dẫn chứng ủng hộ cho giả thuyết trên. Điều này có nghĩa là thông qua sự thâm chuyển qua trung gian liposome virus Nhật Bản gây ngưng kết hồng cầu (hemagglutinating virus of Japan -HVJ) thành tế bào với một tái tổ hợp antisense ODN thì kháng lại được các gen điều hòa chu kỳ tế bào. Khi làm ngừng chu kỳ tế bào thông qua sự phong tỏa 2 tiền gen ung thư *c-myc* hoặc *c-myc* thì thấy ức chế tăng trưởng tân nội mạc trong các mô hình gây tổn thương động mạch. Tuy nhiên, cơ chế đặc hiệu antisense ODN thì cần phải được nghiên cứu tiếp tục hơn nữa. Ngoài việc thâm chuyển các tế bào với antisense ODN, việc làm ngừng lại chu kỳ tế bào cũng có thể đạt được thông qua thao tác hoạt động của các yếu tố phiên mã. Sự hoạt động của nhiều gen điều hòa chu kỳ tế bào bị ảnh hưởng bởi

một yếu tố phiên mã đơn E2F. Trong các tế bào nằm yên, E2F gắn với một phức hợp các protein khác gồm các sản phẩm gen u nguyên bào võng mạc (retinoblastoma -Rb). Rb phòng ngừa sự tương tác của E2F với DNA nhiễm sắc thể và kích thích sự hoạt động của gen. Trong các tế bào đang tăng sinh thì E2F được giải phóng, kết quả là làm hoạt hóa gen của chu kỳ tế bào. Một cái bẫy của yếu tố phiên mã có trình tự liên kết được nhận dạng bởi E2F có thể được sử dụng như một phương tiện để ức chế tăng sinh tế bào. Sử dụng chiến lược này để phòng ngừa sự tăng sinh của VSMC và tăng trưởng nội mạc sau tổn thương động mạch cảnh đã được chứng minh trên chuột. Cách khác lại thâm nhiễm động mạch với các adenovirus khiếm khuyết sao chép mã cho dạng cấu trúc hoạt hóa, không phosphoryl hóa của Rb ở thời điểm tạo hình mạch cũng đã được nghiên cứu. Với cách tiếp cận này đã làm giảm đáng kể sự tăng sinh của các tế bào cơ trơn và sự hình thành tân nội mạc trong mô hình động mạch đùi lợn và động mạch chuột đối với tái hẹp van tim. Những kết quả tương tự cũng thu được với sự biểu hiện vượt mức qua trung gian adenovirus một chất ức chế tự nhiên đối với tiến triển của chu kỳ tế bào, đó là chất ức chế kinase phụ thuộc cyclin p21. Ở đây p21 đã phòng ngừa được sự cường phosphoryl hóa của Rb *in vivo*. Ngoài việc phong tỏa sự biểu hiện của chu kỳ tế bào, việc làm gián đoạn tải nạp tín hiệu tạo phân bào cũng thu được kết quả trong các mô hình thực nghiệm. Chẳng hạn như, các protein Ras là chất tải nạp chủ chốt các tín hiệu tạo phân bào từ màng tới nhân tế bào của nhiều dạng tế bào. Sự chuyển giao cục bộ các vec tơ DNA biểu hiện các thể đột biến Rb không trội với sự can thiệp của Ras đã làm giảm sự hình thành các tổn thương tân nội mạc ở mô hình gây tổn thương động mạch cảnh chuột. Nitric oxyde là trung gian cho nhiều quá trình sinh học làm giảm nhẹ sự hình thành tân nội mạc ở thành mạch. Quá trình này bao gồm: Ức chế tăng sinh VSMC, giảm kết dính tiểu cầu, giãn mạch, thúc đẩy sự sống sót của các tế bào nội mô và có thể làm giảm cả stress oxy hóa. Việc chuyển giao *in vivo* DNA plasmid mã cho nitric oxyde synthase của tế bào nội mô (endothelial cell nitric oxyde synthase -ecNOS) đã được đánh giá như một chiến lược cận tiết tiềm ẩn để ngăn chặn các bệnh tân nội mạc. DNA bổ cứu ecNOS (cDNA) được điều khiển bởi promoter β -actin và yếu tố kích thích CMV đã được tải nạp vào các VSMC của động mạch cảnh chuột sau khi gây tổn thương mạch. Mô hình này cho thấy có sự tăng trưởng lớn các tế bào nội mô trong thời gian 2-3 tuần sau khi gây tổn thương và vì vậy mà nó có khả năng làm mất sự biểu hiện của ecNOS nội sinh. Những kết quả này cho thấy sự biểu hiện của gen chuyển trong thành mạch cùng với việc tăng cường hoạt tính vận mạch có thể ức chế tới 70% sự hình thành tân nội mạc. Phương pháp gây độc tế bào trực tiếp nhằm phòng ngừa sự hình thành tân nội mạc có thể có liên quan tới việc chuyển một gen tự sát như gen thymidine kinase của virus herpes simplex (*HSV-tk*) vào trong VSMC. Nhờ sử dụng vec tơ adenovirus nên *HSV-tk* đã được đưa vào VSMC của động mạch chuột và đã hoàn trả sự nhạy cảm của các tế bào cơ trơn đối với một nucleotide tương tự như ganciclovir ngay sau khi tổn thương mạch. Sau một liệu trình trị liệu với ganciclovir, tăng sinh nội mạc giảm xuống khoảng 50% trong hệ thống mô hình đó. Gần đây hơn đã có các nghiên cứu cảm ứng bộ máy nội sinh cho sự tự sát của VSMC – một chiến lược được thiết kế nhằm ức chế sự tăng trưởng hoặc làm thoái lui tổn thương nội mạc. Chiến lược này liên quan tới sự phong tỏa antisense ODN của các gen còn sống sót như *Bcl-x*, giúp cho các tế bào tránh khỏi sự hoạt hóa chết theo chương trình – apoptosis.



Hình 17.2 Ước chế tăng trưởng tân nội mạc bằng GTL *in vivo* nitric oxide synthase tế bào nội mô (ecNOS) trong động mạch cảnh chuột đã được gây tổn thương mạch.

(Theo Victor J. Dzau, Afshin Ehsan và Micael J. Mann. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

17.4 Gen trị liệu sự tạo mạch

17.4.1 Sự tạo mạch và các yếu tố của sự tạo mạch

Việc phát hiện ra các đặc trưng của yếu tố tăng trưởng sự tạo mạch đã tạo cơ hội cho trị liệu tạo mạch mới của mô nhằm hoàn trả sự thiếu máu cục bộ do các bệnh tắc động mạch một cách tự nhiên. Người ta đã xác định trong nhiều mô hình động vật rằng, các yếu tố tạo mạch có thể kích thích tăng trưởng mạng lưới mao mạch *in vivo*. Nhưng cũng ít chắc chắn là những phân tử này có thể cảm ứng phát triển các mạch to hơn, phức tạp hơn trong các mô trưởng thành để đáp ứng sự chuyển chở ngày càng tăng của một dòng máu lớn. Tuy nhiên, khả năng này cũng được đánh giá cao, thậm chí ngay cả những vấn đề liên quan tới vi mạch cũng được coi như một cách tiếp cận sinh học để điều trị sự thiếu máu cục bộ của mô, tất cả những vấn đề đó đã làm nảy sinh các thử nghiệm lâm sàng trên người về trị liệu sự tạo mạch mới.

Mô tả đầu tiên về hiệu ứng tạo mạch của các yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (fibroblast growth factor -FGF) cần phải nhắc đến là việc phát hiện ra sự đa dạng của các yếu tố tiền tạo mạch. Những yếu tố này đã kích thích sự tăng sinh tế bào nội mô hoặc

tăng cường di chuyển của các tế bào nội mô. Trong một số trường hợp, các hoạt tính này đều đã quan sát thấy. Danh sách các yếu tố tạo mạch bao gồm nhiều dạng phân tử như yếu tố tăng trưởng các chất giống insulin, yếu tố tăng trưởng tế bào gan, agiopoetin và yếu tố tăng trưởng các nội mô từ tiểu cầu. Các phân tử này đã được chú trọng nhất với tư cách là các tác nhân trị liệu sự tạo mạch mới. Tuy nhiên, yếu tố tăng trưởng nội mô của mạch (vascular endothelial growth factor –VEGF) và 2 thành viên của họ FGF là FGF acid (FGF-1) và FGF kiềm (FGF-2) đều chia sẻ khả năng kích thích sự tăng trưởng mao mạch trong các mô hình kinh điển như màng aflantoic của gà chẳng hạn. Tuy nhiên, vẫn còn nhiều tranh luận liên quan tới các tác nhân cũng như con đường tối ưu của việc chuyển giao các yếu tố điều trị sự tạo mạch trong cơ tim người thiếu máu cục bộ hoặc khi lượng máu xuống thấp cực điểm. VEGF có thể là một tác nhân được lựa chọn trước nhất cho việc kích thích tăng sinh tế bào nội mô, tuy vậy các receptor của VEGF cũng biểu lộ trên nhiều tế bào gây viêm khác kể cả các thành viên của dòng đại thực bào - bạch cầu đơn nhân. Sự lựa chọn này có lợi thế vì sự kích thích không mong muốn của các nguyên bào sợi và VSMC trong các động mạch tự nhiên cũng có thể làm tăng tổn thương tâm nội mạc hoặc làm xơ cứng động mạch. Các FGF có lẽ là các chất kích thích tiềm năng đối với sự tăng sinh tế bào nội mô, nhưng lại ít được lựa chọn nhất trong tác động tiền tăng sinh.

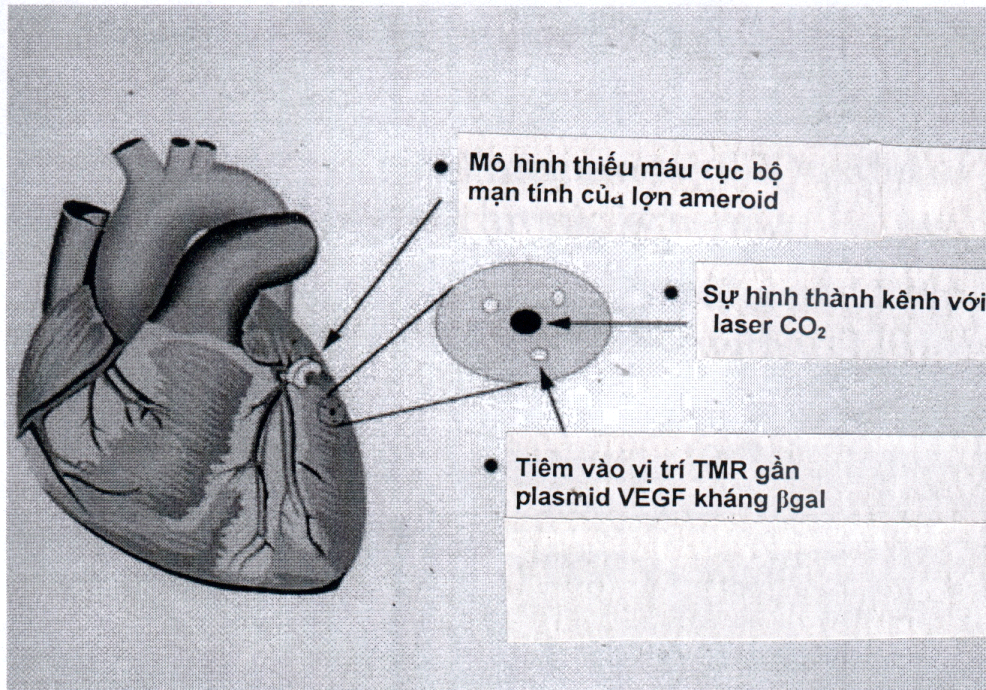
17.4.2 Gen trị liệu sự tạo mạch

Các nghiên cứu tiền lâm sàng GTL tạo mạch đã áp dụng nhiều mô hình thiếu máu cục bộ mạn tính. Sau khi dùng VEGF đã làm tăng mật độ mao mạch ở chân sau thỏ thiếu máu cục bộ. Kết quả này không khác biệt đáng kể bất chấp VEGF được chuyển giao như kiểu đưa một khối protein lớn vào trong động mạch hay khi đưa DNA plasmid vào bề mặt thành động mạch hoặc tiêm trực tiếp plasmid vào chân thiếu máu cục bộ. Khi tiêm trực tiếp một vec tơ adenovirus mã cho VEGF sẽ cải thiện được sự tưới nước (truyền dịch) cục bộ cơ tim (regional myocardial perfusion) và đẩy thành tâm thất do stress. Những kết quả này được thể hiện trong mô hình thiếu máu cục bộ cơ tim mạn của lợn được cảm ứng qua việc thay thế cơ Ameroid đang bít lại dần quanh động mạch vành.

Không như VEGF, FGF-1 và FGF-2 lại có các trình tự tín hiệu tạo thuận lợi cho sự tiết protein. Vì thế việc chuyển giao các trình tự gen này không làm thỏa mãn yếu tố tăng trưởng cho các tế bào nội mô đích. Để khắc phục giới hạn này người ta đã sắp đặt một plasmid mã cho phân tử FGF-1 cải biến trên đó một trình tự dẫn kỵ nước được thêm vào để làm tăng sự tiết. Khi chuyển giao plasmid này tới thành động mạch đùi ngay cả với hiệu ứng thâm chuyển thấp cũng đã nâng cao được mật độ mao mạch và làm giảm sự kháng mạch ở chân sau thỏ thiếu máu cục bộ. Một chiến lược tương tự tiêm qua tĩnh mạch vành 10^{11} hạt virus của vec tơ adenovirus mã cho FGF-5 của người có chứa trình tự tín hiệu ở đầu tận amino. Quy trình này cho kết quả làm tăng sự dày lên của thành mạch với stress và có nhiều hơn các cấu trúc tạo mạch trên các sợi cơ tim sau 2 tuần chuyển gen.

Một cách tiếp cận mới khác đối với sự tạo mạch mới là kết hợp sự chuyển gen yếu tố tăng trưởng với việc điều phối tiềm ẩn kích thích sự tạo mạch, đó là phương pháp trị liệu truyền cơ tim với laser (transmyocardial laser therapy). Sự hình thành các kênh laser có thể thể biến hóa được transmural chưa được thiết lập hoàn toàn như một phương tiện hiệu lực để tăng dòng chảy phụ. Những thành công trong lâm sàng đã được ghi nhận là giảm đau và cải thiện sự tưới nước của cơ tim. Trong mô hình Ameroid trên lợn, người ta

tiêm trực tiếp DNA plasmid mã cho VEGF ở vùng xung quanh nơi hình thành kênh laser thấy có sự bình thường hóa tốt hơn về chức năng cơ tim so với cách trị liệu đơn. Với chiến lược trị liệu này, ngày nay có thể được thực hiện việc chuyển gen thông qua kỹ thuật mổ ngực tối thiểu hoặc đặt ống dẫn dưới da (Hình 17.3).



Hình 17.3 Kết hợp giữa sự chuyển gen và tái tạo mạch bằng truyền cơ tim với laser (transmyocardial laser revascularization – TMR). Đây là sơ đồ đại diện cho sự thiếu máu cục bộ mạn tính cảm ứng bởi sự thay thế cơ Ameroid quanh động mạch vành ở lợn. Tim bị thiếu máu cục bộ đã trải qua TN4R sau khi tiêm plasmid mã cho VEGF thì sự bình thường hóa chức năng cơ tim hơn là trị liệu đơn.

(Theo Victor J. Dzau, Afshin Ehsan và Micael J. Mann. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Các nghiên cứu về độ an toàn pha I đã được đề cập, trong đó các yếu tố tạo mạch và các gen mã cho các yếu tố này đã được sử dụng cho một số bệnh nhân. Những nghiên cứu này liên quan tới việc sử dụng các yếu tố tạo mạch ngoại biên hoặc với động mạch vành ở những bệnh nhân không thể trị liệu sự tái tạo mạch một cách thông thường hoặc ứng dụng các yếu tố tiền tạo mạch như một “phụ tá” cho sự tái tạo mạch truyền thống. Những liều lượng hiện đại nhất của các yếu tố protein hoặc các chất liệu gen được chuyển giao trong các nghiên cứu này đều không gây ra bất kỳ độc tính cấp nào. Tuy nhiên vẫn còn một số vấn đề liên quan là tính an toàn của các phân tử như có thể làm tăng trưởng những khối u bí ẩn hoặc làm tăng bệnh vớng mạc do tiểu đường và ngay cả các bệnh tắc động mạch. Mặc dầu sớm thu được những kết quả thú vị, nhưng vẫn cần phải trải nghiệm việc sử dụng các vec tơ virus đối với nhiều bệnh nhân. Vì thế cũng chưa xác định được những

thảm họa sinh học tiềm tàng khi có sự đảo ngược từ trạng thái không sao chép thành trạng thái sao chép hay những đột biến và tái tổ hợp sẽ được biểu lộ dần dần như thế nào.

Ngoài ra, cũng chưa rõ là trong lâm sàng truyền thống (đặt ống thông càng ngày càng lớn hơn) nhưng vẫn không đảm bảo được sự lưu thông dòng chảy, vậy thì thông qua các chiến lược sinh học mà chủ yếu là tăng mạng lưới vi mạch phụ có thu được hiệu quả không? Chúng ta cũng nhớ rằng chính sự tạo mạch mới cũng là một quá trình xảy ra một cách tự nhiên. Khi chúng ta cho thêm một yếu tố đơn thì không thể vượt qua được các điều kiện để có được sự đáp ứng đối với sự tạo mạch nội sinh mới trong các bệnh nhân thiếu máu cục bộ ở cơ tim và các chi thấp hơn. Mặc dầu có những giới hạn, nhưng GTL tạo mạch có thể vẫn tạo ra được các bước đột biến mà hiện nay chúng ta chưa thể giải quyết được đối với các bệnh nhân mắc các bệnh vô phương cứu chữa. Hơn nữa, GTL tạo mạch cũng có thể cống hiến một “phụ tá” cho trị liệu truyền thống để nâng cao hiệu quả một cách lâu dài.

17.5 Gen trị liệu sự ghép mạch

17.5.1 Những cải biến sinh học đối với ghép tĩnh mạch

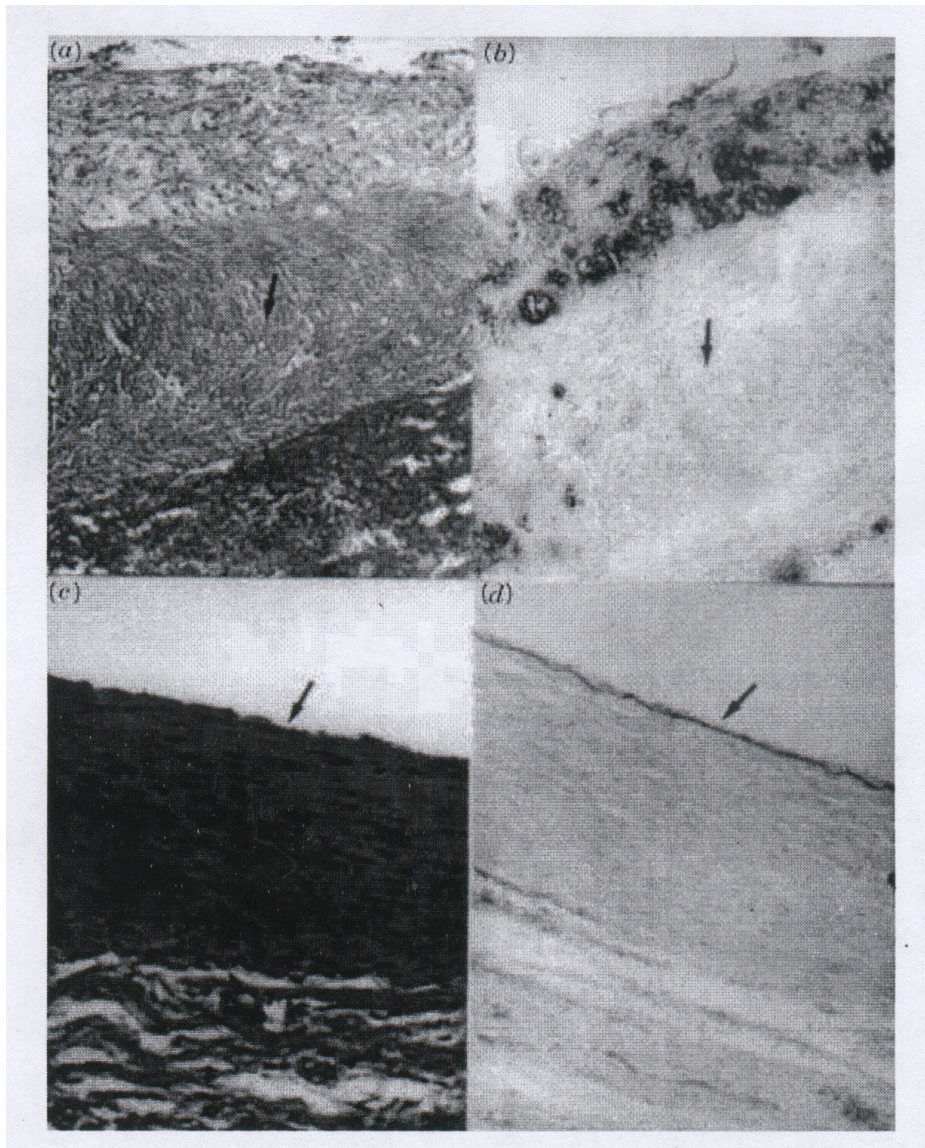
Việc tái tạo mạch bằng phẫu thuật để đem lại kết quả lâu dài là cực kỳ thấp và sự lưu thông của mạch vành vẫn bị hạn chế đáng kể do thất bại trong ghép tĩnh mạch đồng loại (bản thân). Biện pháp được lý học cũng không thành công trong việc phòng ngừa những bệnh cần phải ghép lâu dài như tăng trưởng tân nội mạc hoặc xơ cứng động mạch. Gen trị liệu đã mở ra một “đại lộ” mới cải biến sinh học cho sự ghép tĩnh mạch, làm giảm sự chết chóc do cấy ghép không thành công. Việc thâm chuyển bằng phẫu thuật trong ghép tĩnh mạch đã tạo cơ hội cho sự kết hợp các kỹ thuật chuyển DNA mô nguyên vẹn cùng với việc làm tăng độ an toàn trong thâm nhiễm *ex vivo*. Nhiều tài liệu đã nói về tính khả thi của sự chuyển *ex vivo* trong ghép tĩnh mạch với vec tơ virus.

Vấn đề lớn nhất của thất bại trong ghép tĩnh mạch có liên quan tới bệnh thuộc tân nội mạc- sự sửa đổi lại một phần tổ chức ghép sau phẫu thuật. Mặc dầu sự tăng trưởng tân nội mạc đã góp phần làm giảm sự căng (stress) thành tĩnh mạch được ghép, nhưng quá trình này cũng có thể dẫn tới sự hẹp trở lại của các ống ghép ngay từ những năm đầu sau khi phẫu thuật. Hơn nữa, lớp tân nội mạc bất thường lại sản sinh ra các protein gây tiền viêm – đó là nền tảng của dạng xơ vữa động mạch tích tụ làm cho việc ghép muện không thành công.

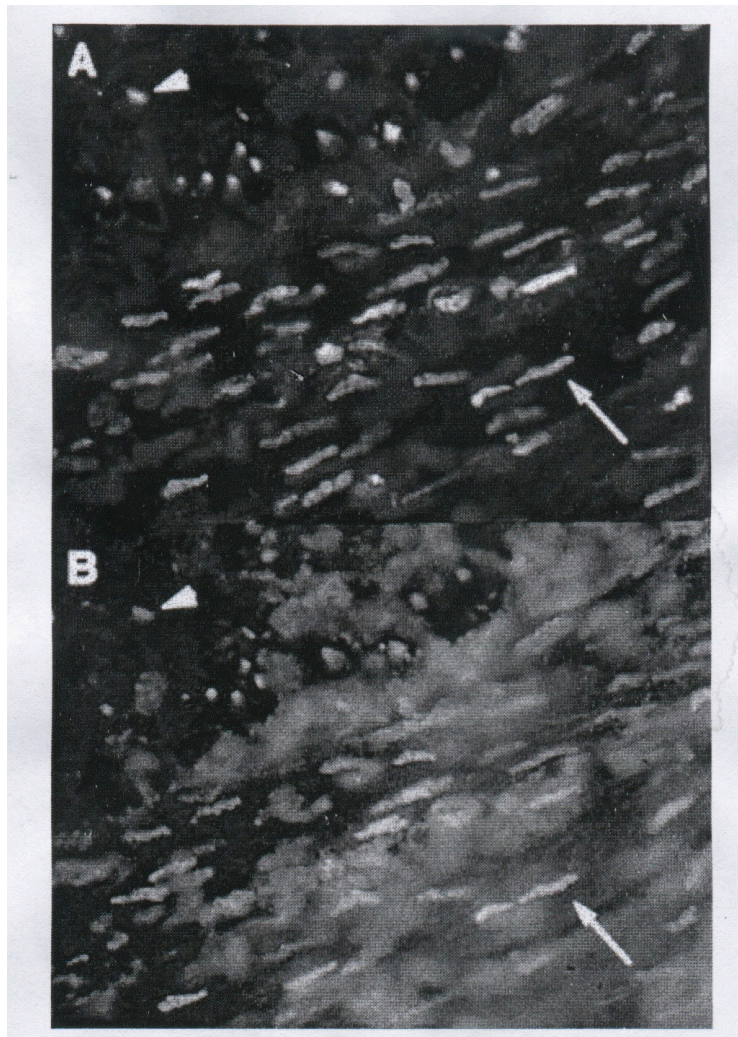
Như trong mô hình gây tổn thương động mạch, một tổ hợp antisense ODN ức chế biểu hiện của ít nhất 2 gen điều hòa chu kỳ tế bào có thể ngăn chặn đáng kể sự tăng trưởng tân nội mạc trong ghép tĩnh mạch. Hơn nữa bẫy ODN với E2F (E2F decoy ODN) cũng có hiệu ứng tương tự trong ghép tĩnh mạch nếu so sánh với mô hình gây tổn thương động mạch. Trái ngược với gây tổn thương động mạch, ghép tĩnh mạch chẳng những khắc phục được tổn thương đơn lẻ ở thời điểm phẫu thuật mà còn kích thích sự sửa đổi huyết động lực học một cách thường xuyên (chronic hemodynamic).

Mặc dầu vậy, với những kích thích thường xuyên này thì việc xử lý các tĩnh mạch ghép với bẫy ODN bằng phẫu thuật cũng đem lại kết quả trong việc kháng lại sự tăng trưởng tân nội mạc tới 6 tháng ở mô hình trên thỏ. Trong thời điểm này, các tổ chức ghép đã phong tỏa chu kỳ tế bào và vì thế nó có thể được chấp nhận để chữa các bệnh động

mạch qua sự phì đại của lớp trung mạc. Hơn nữa, những ống dẫn công nghệ gen có thể kháng lại sự xơ vữa động mạch, chúng có liên quan tới sự định hình chức năng của nội mô (Hình 17.4).



Hình 17.4 Kiểm soát sự xử lý oligonucleotide (A và B) và antisense oligonucleotide (kháng c và 2 kinasae/PCNA) xử lý ghép tĩnh mạch (C và D) trong tăng cholesterol ở thỏ 6 tuần sau phẫu thuật (x70). Lưu ý rằng sự nhuộm màu với hematoxylin/van Gieson (A và C) và một kháng thể đơn dòng kháng đại thực bào thỏ (B và D). Các mũi tên chỉ các phiến mỏng co giãn bên trong.
(Theo Victor J. Dzau, Afshin Ehsan và Micael J. Mann. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)



Hình 17.5 Sự thâm chuyển qua trung gian phẫu thuật áp lực của ODN đánh dấu huỳnh quang tới các tế bào ghép tĩnh mạch lộ thiên. (A) sự bắt màu của chất nhuộm sắc nhân Hoechst 33,342 của ghép tĩnh mạch ở các phần giao nhau, sự định vị của nhân trong thành mạch ghép (100x). (B) Sự tương tự của các tĩnh mạch lộ thiên dưới epifluorescence FITC ở 100x. Lưu ý mẫu huỳnh quang xanh tăng cường ở nhân của các tế bào trong thành mạch ghép chỉ rõ sự định vị nhân của ODN đánh dấu.
(Theo Victor J. Dzau, Afshin Ehsan và Micael J. Mann. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Các thử nghiệm lâm sàng “mù kép ngẫu nhiên” (randomized double-blind clinical trials) với việc ghép tĩnh mạch người - viễn cảnh của việc điều trị với bẫy ODN cũng đã được thực hiện mới đây. Việc chuyển giao hiệu quả ODN được hoàn tất trong vòng 15 phút với phẫu thuật thay thế mảnh ghép khi có một thiết bị bọc lộ mạch với ODN trong dung dịch

sinh lý. Thiết bị này đã tạo nên một môi trường điều hòa có áp suất khoảng 300mmHg (Hình 17.5). Những phát hiện ban đầu đã xác định được rằng chuyển giao ODN tới được 80% số tế bào ghép và đã phong tỏa hiệu quả sự biểu hiện gen đích. Nghiên cứu này định lượng được hiệu ứng phong tỏa gen của chu kỳ tế bào tác động tới tỷ lệ hư mảnh ghép và là một trong những chủ đích đầu tiên của việc xác định tính khả thi của các thao tác gen trong lâm sàng điều trị các bệnh thông thường.

Cùng với việc phát triển các phương pháp chuyển gen qua trung gian virus, một số nhà nghiên cứu đã bắt đầu khai thác khả năng sử dụng các hệ thống này trong ghép tĩnh mạch đồng loại *ex vivo*. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh có biểu hiện các dấu chuẩn gen β -galactosidase dọc theo bề mặt khoang mạch và ngoại mạc 3 ngày trong ghép tĩnh mạch ở lợn được thâm nhiễm với vec tơ adenovirus khiếm khuyết sao chép trong 2 giờ tại thời điểm phẫu thuật. Các nghiên cứu khác lại khai thác sử dụng hệ thống tải nạp cơ sở adenovirus mới trong đó các hạt adenovirus gắn với DNA plasmid thông qua phức hợp biotin/streptavidin-transferin/polylysine. Sự biểu hiện của β -galactosidase theo các tài liệu là 3 và 7 ngày sau phẫu thuật ghép tĩnh mạch ở thỏ, nếu trước khi ghép được ủ với phức hợp trên trong thời gian 1 giờ. Người ta đã thấy sự có mặt của các tế bào tải nạp ở lớp trung và ngoại mạc.

Tính khả thi của sự chuyển gen trong ghép tĩnh mạch đã dẫn tới việc tìm ra những điểm nút của trị liệu tiềm năng như sự hình thành tân nội mạc. Những nghiên cứu này đã sử dụng adenovirus khiếm khuyết sao chép, biểu hiện chất ức chế mô metalloproteinase-2 (TIMP-2) để làm giảm sự hình thành tân nội mạc trong mô hình nuôi cấy tổ chức tĩnh mạch lộ thiên. Các nghiên cứu khác lại ứng dụng việc thâm nhiễm trong khi phẫu thuật một gen chất ức chế từ các tế bào già (senescent cell-derived inhibitor *sdi,1*) – một chất trung gian điều hòa xuống gen kiểm chế khối u *p53* và hệ HVJ-liposome đã làm giảm sự hình thành tân nội mạc.

17.5.2 Công nghệ sinh học và gen trị liệu

Sự chuyển gen chẳng những được ứng dụng trong ghép tĩnh mạch mà còn được sử dụng trong nhiều trường hợp khác nữa. Sự tạo đông máu của các chất liệu giả prosthetic như poly (tetrafluoroethylene-PTFE) hoặc Dacron đã làm giới hạn việc sử dụng chúng với tư cách là các chất thay thế động mạch đường kính nhỏ. Chiến lược GTL cơ sở tế bào được công nghệ hóa tổ hợp có thể làm giảm sự tạo đông máu này. Đã có các tài liệu mô tả phân lập được các tế bào nội mô đồng loại và cấy chúng vào các tổ chức ghép giả trong các mô hình động vật. Hơn nữa có giả thuyết cho rằng có thể nâng cao chức năng của các tế bào nội mô thông qua việc chuyển gen trước khi cấy các tế bào này lên bề mặt tổ chức ghép. Đã có những báo cáo bước đầu về việc sử dụng chiến lược này để nội mô hóa sự ghép mạch giả với các tế bào nội mô đồng loại tải nạp với một retrovirus tái tổ hợp mã cho gen *lacZ*. Tuy nhiên, vẫn chưa có các thông cáo về việc áp dụng thành công trong lâm sàng về vấn đề này. Để làm giảm sự tạo đông máu trong cấy ghép, người ta đã cấy Dacron 4-mm vào các tế bào nội mô đã được tải nạp retrovirus mã cho gen chất hoạt hóa plasminogen người (human tissue plasminogen activator –TPA). Tổ chức ghép này sau đó được cấy vào động mạch cảnh và động mạch đùi của cừu. Tác dụng phân giải của TPA sẽ làm giảm sự kết dính của tế bào nội mô được cấy ghép nhưng vẫn không cải thiện được sự tạo đông máu trên bề mặt.

17.6 Gen trị liệu các bệnh tim

Cơ tim rất dễ tiếp thu các gen ngoại lai. Cũng như các cơ khác, người ta có thể đo được hoạt tính của gen sau khi tiêm trực tiếp plasmid vào mô cơ tim *in vivo*. Mặc dầu chỉ giới hạn vài milimet quanh vị trí tiêm, nhưng những quan sát này đã đặt cơ sở cho việc xem xét sự chuyển gen như là một cách trị liệu các bệnh tim. Đồng thời cả vec tơ adenovirus và virus adeno liên hợp đều có thể được chuyển tới các tế bào cơ tim và các tế bào mạch vành thông qua việc tiêm trực tiếp hoặc truyền qua mạch vành các chế phẩm cô đặc trong các mô hình trên thỏ và lợn. Sự chuyển gen vào tim cũng thu được kết quả qua việc tiêm trực tiếp hoặc truyền qua mạch vành các tế bào nguyên bào cơ đã được công nghệ hóa trong nuôi cấy tế bào.

17.6.1 Suy tim xung huyết

Receptor β gây tiết adrenalin (β -adrenergic receptor – β -AR) giữ vai trò đặc biệt quan trọng trong việc làm trung gian trạng thái hướng ion của tim. Receptor này được chú ý đáng kể như đích của sự can thiệp trị liệu gen trong suy tim xung huyết. Những chuột chuyển gen biểu hiện β 2-AR dưới sự kiểm soát của promoter phức hợp hòa hợp tổ chức chính của tim (X-MHC). Những động vật này biểu hiện khoảng 200 lần mức β 2-AR cùng với việc tăng mạnh sự co rút, tăng nhịp tim khi vắng mặt chủ vận β ngoại biên (exogenous β -agonist). Thao tác này của cơ tim đã tạo nên sự quan tâm rất lớn trong việc chuyển gen đối với gen β -AR vào các cơ tim bệnh và được coi như là một cách can thiệp trị liệu. Cho tới nay, ý định khai thác khả năng thú vị này đã bị giới hạn bước đầu trong hệ thống nuôi cấy tế bào. Tuy nhiên, những nghiên cứu gần đây lại chuyển các kỹ thuật này vào trong các nghiên cứu trên động vật. Chẳng hạn như việc chuyển gen β 2-AR người qua trung gian adenovirus đã cải thiện được sự co rút cơ tim tâm thất thỏ đang tiến tới suy huyết động lực.

Khi tiêm cấu trúc plasmid β 2-AR vào tâm nhĩ phải chuột đã làm tăng hiệu ứng điều nhịp. Tuy nhiên vẫn chưa ước lượng được khả năng tăng cường co rút khi chuyển gen vào tâm thất. Những kết quả này đã chứng minh tính khả thi của việc sử dụng β -adrenergic và các chất điều nhịp của nó như một phương tiện để đề cập tới hiệu ứng bệnh tim.

Hiện nay người ta cũng quan tâm tới việc làm tăng cường co rút qua thao tác mức calci nội bào. Enzyme vận chuyển Ca^{+2} ATPase của lưới cơ tương (sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} ATPase), (SERCA2a) điều hòa sự cô lập Ca^{+2} trong lưới cơ tương (SR) đã làm giảm bệnh lý học cơ tim trong thực nghiệm cũng như trên người.

Sự biểu hiện quá mức protein SERCA2a ở các tế bào cơ tim chuột mới sinh đã thu được kết quả khi chuyển gen qua trung gian adenovirus. Điều này dẫn đến tăng sự giải phóng (Ca^{+2} li) đến đỉnh điểm và làm giảm mức (Ca^{+2} li) nằm yên (resting) và quan trọng hơn là tăng cường sự co rút của các tế bào cơ tim. Thành công của cách tiếp cận này trong việc làm tăng cường sự co rút của cơ tim *in vivo* cũng đã được ghi trong một số tài liệu. Chắc chắn là GTL sẽ cho chúng ta một phương tiện hấp dẫn mới để điều trị bệnh suy tim.

17.6.2 Nhồi máu cơ tim

Nhồi máu cơ tim (myocardial infarction –MI) là nguyên nhân thông thường nhất gây ra sự suy tim. Ở mức độ tế bào, MI sẽ dẫn đến sự hình thành sẹo hợp bởi các nguyên bào sợi

tim. Sự biệt hóa cuối cùng của các tế bào cơ tim đã làm mất khối lượng tế bào do đó gây nên sự nhồi máu chứ không phải làm tái sinh các tế bào cơ để khôi phục sự thương tổn. Hơn nữa, các nhà nghiên cứu cũng đang theo đuổi khả năng chuyển đổi của các nguyên bào sợi tim chuyển đổi gen thành các tế bào cơ tim có chức năng. Tính khả thi của vấn đề này đã được trợ giúp bởi các nghiên cứu về sự chuyển gen. Những công trình này sử dụng sự chuyển gen qua trung gian retrovirus để chuyển đổi *in vitro* nguyên bào sợi tim thành các tế bào tương tự các tế bào cơ xương thông qua sự biểu hiện ép buộc gen xác định dòng cơ xương *MyoD* (skeletal muscle lineage dermining gen, *MyoD*). Các nguyên bào sợi biểu hiện gen *MyoD* quan sát thấy có sự phát triển các ống cơ đa nhân (multinucleated myoblast) tương tự như cơ vân biểu hiện yếu tố tăng cường đặc hiệu tế bào cơ và MHC. Các nghiên cứu khác cũng chỉ rõ rằng sự thâm chuyển tim chuột bị thương tổn do làm đông lạnh với adenovirus có chứa gen *MyoD* đã biểu hiện được myogenin và MHC xương phôi thai. Tuy nhiên, ở thời điểm này, chưa tìm thấy các tế bào chức năng ở vùng sẹo của cơ tim khi đã được chuyển gen *in vivo*.

17.6.3 Thiếu máu cục bộ và sự tưới nước (tái truyền dịch)

Xơ vữa động mạch và hậu quả của thiếu máu cục bộ (TMCB) là nguyên nhân dẫn đến tử vong ở các nước phát triển. Tổn thương tái truyền dịch liên quan chặt chẽ với sự hủy hoại tế bào và sự tiến triển của TMCB. Ngoài kích thích tái tạo mạch mới bằng bằng trị liệu, các thao tác gen cũng có thể được sử dụng như các phương tiện nhằm giới hạn mức độ thương tổn cơ tim sau TMCB và tái truyền dịch.

Một cách vắn tắt là ở thời kỳ TMCB có sự tích tụ adenosine monophosphate và sau đó tăng mức hypoxanthine ở bên trong và xung quanh vùng bị tác động. Đồng thời xảy ra việc chuyển đổi xanthine dehydrogenase thành xanthine oxydase. Khi tiếp xúc với oxy trong thời kỳ tái truyền dịch thì hypoxanthine sẽ chuyển thành xanthine. Sự chuyển đổi này dẫn đến việc tạo ra các gốc oxy gây độc tế bào - anion superoxyde (O_2^-). Gốc tự do này tiếp tục tạo thành hydrogen peroxyde ($H_2 O_2$) - một gốc oxy khác. Ion Fe^{+2} được tích tụ lại trong lúc TMCB sẽ phản ứng với $H_2 O_2$ tạo nên gốc oxy tiềm năng - anion hydroxyl ($OH^\cdot$). Các gốc tự do này sẽ làm tổn thương tế bào thông qua sự peroxyde hóa lipid màng sinh chất, sự oxy hóa các nhóm sulfhydryl của các protein nội bào và protein màng, tổn thương acid nucleic và phân giải các thành phần chất nền ngoại bào như collagen và acid hyaluronic. Chức năng của những “thợ quét đường” (scarvengers) các gốc oxy tự nhiên như superoxyde dimustase (SOD), catalase, glutathion peroxydase và hemooxygenase (HO) thông qua nhiều cơ chế sẽ chuyển đổi các gốc oxy ở các mô bình thường và mô bị tổn thương.

Mức độ hình thành các gốc tự do sau tổn thương tái truyền dịch-TMCB (ischemia-reperfusion injury) ở tim có thể “chôn vùi” hết hệ thống quét đường này. Vì thế, sự biểu lộ quá mức SOD ngoại bào (extracellular SOD - ecSOD) hoặc manganese SOD (MnSOD) ở những chuột chuyển gen đã cải thiện chức năng tim sau TMCB và giảm sự tổn thương của ty thể tế bào cơ tim khi chuột được xử lý với adriamycin. Những phát hiện này đã chứng minh vai trò của các thợ quét đường như một phương tiện để bảo vệ cơ tim ngay cả với sự cố tái truyền dịch -TMCB. Sự bảo vệ thực sự quan sát thấy ở thỏ là kháng lại sự “bất tỉnh nhân sự” của cơ tim khi tiêm vào động mạch một adenovirus có chứa gen *ZnSOD*. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào khảo sát hiệu ứng kháng oxy hóa trực tiếp và sau đó là nâng cao chức năng của cơ tim sau tổn thương tái truyền dịch và TMCB. Việc áp

dụng công nghệ GTL có thể tạo được một cách tiếp cận mới hấp dẫn để kháng lại sự tổn thương TMCB cơ tim, khi ta hợp nhất được một tổ hợp biểu hiện gen chuyển được điều hòa dài hạn.

Ngoài việc làm biểu hiện quá mức gen chống oxy hóa, một số nhà nghiên cứu còn dự định can thiệp vào chương trình biểu hiện gen trong cơ tim để điều hòa xuống hiệu ứng độc của sự tái truyền dịch của TMCB. Chẳng hạn như việc thâm chuyển cơ tim chuột với bẫy oligonucleotide để phong tỏa hoạt tính của yếu tố phiên mã sự nhạy cảm với sự oxy hóa NF- κ B, có lẽ đó là một cách tiếp cận thực tiễn. NF- κ B liên quan tới sự biểu hiện của nhiều tiền gen gây viêm (proinflammatory genes). Nó đã ức chế được việc làm giảm kích cỡ nhồi máu sau khi thất động mạch vành.

Thao tác gen đối với các mô cũng tạo cơ hội kiểm chế miễn dịch đặc hiệu ghép khi ghép tim. Mặc dầu các động vật chuyển gen đã được khai thác như một nguồn tiềm năng bảo vệ miễn dịch đối với các mô ghép khác loài, nhưng sự chuyển giao các gen của protein kiểm chế miễn dịch hoặc phong tỏa các gen xác định ở người cho mới cho phép kiểm chế miễn dịch cục bộ đặc hiệu vị trí. Đồng thời, những cách tiếp cận này cũng làm giảm hoặc loại bỏ hẳn sự cần thiết đối với các tác nhân kiểm chế miễn dịch hệ thống độc hại. Về sự hoạt động các gen trong các tài liệu đã chỉ rõ ghép được tim chuột ít nhất 2 tuần sau khi tiêm vào mô trong lúc phẫu thuật DNA plasmid hoặc các vec tơ retrovirus hay adenovirus. Khi chuyển gen TGF- β hoặc interleukin-10 vào một khu vực nhỏ của tim bằng cách tiêm trực tiếp đã làm thúc đẩy sự kiểm chế miễn dịch với loại thải mảnh ghép. Hoạt tính miễn dịch qua trung gian tế bào cũng bị ức chế và sự thải loại cấp sẽ muộn hơn. Trong một nghiên cứu khác người ta phân phối có tính hệ thống antisense ODN kháng trực tiếp các phân tử kết dính nội bào (intercellular adhesion molecules -ICAM-1) cũng kéo dài sự tồn tại của mảnh ghép và cảm ứng sự dung nạp dài hạn khi kết hợp với kháng thể đơn dòng kháng ligand của ICAM-1 và kháng nguyên bạch cầu.

17.7 Tóm lại

Lĩnh vực GTL đang tiến triển từ khoa học thực nghiệm sang trị liệu lâm sàng. Hiện nay công nghệ này đã cho chúng ta có một cách nhìn khái quát về tiềm năng trị liệu của nó. Tuy nhiên, để áp dụng một cách thường nhật thì vẫn đòi hỏi những cải tiến về kỹ thuật cùng với việc phát triển thêm các phương pháp chuyển gen mới. Điều quan trọng là, không một phương pháp chuyển gen nào được khẳng định là chắc chắn. Tốt nhất là sử dụng tất cả các kỹ thuật đơn lẻ hoặc tổ hợp để nhận được hiệu ứng cao nhất. Cách đây hơn hai thập kỷ, các nhà khoa học đã mở khóa được mật mã di truyền, vì thế những hiểu biết về bệnh lý học các bệnh càng tích tụ được nhiều. Với sự tham gia của công nghệ gen, chắc chắn sẽ nâng cao hơn nữa hiệu quả điều trị các bệnh mắc phải phức tạp và các bệnh bẩm sinh mà trước đây đành phải bó tay.

Chương XVIII

ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH THUỘC HỆ THẦN KINH

18.1 Mở đầu

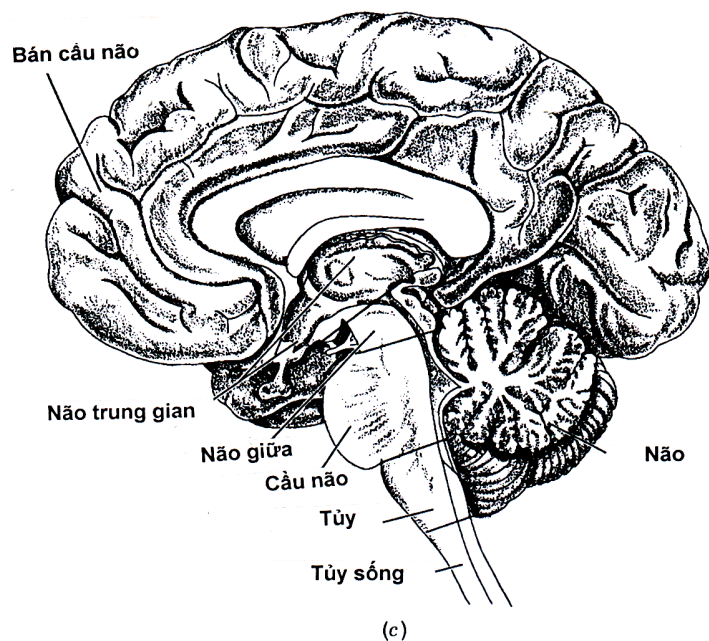
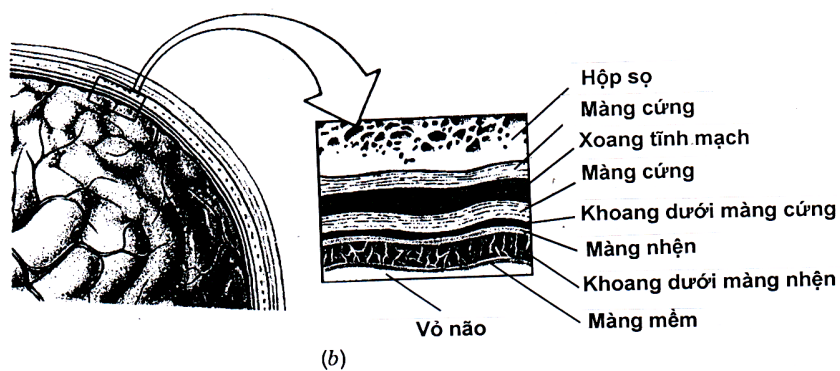
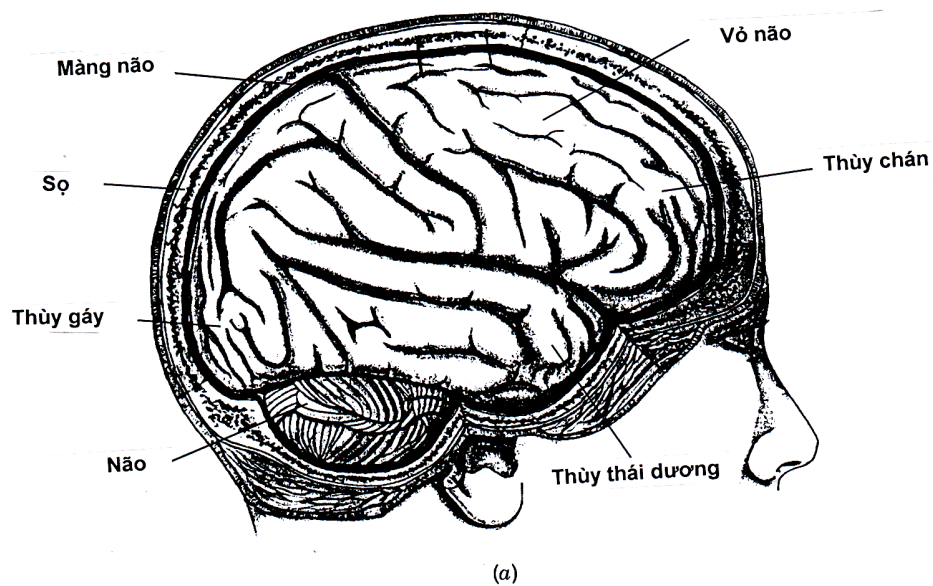
Sự phức tạp của hệ thần kinh đã đặt ra một số thách thức cho các nhà khoa học và các thầy thuốc lâm sàng - những người đang tìm kiếm việc ứng dụng GTL cho các bệnh thần kinh. Ngoài các vấn đề tiêu chuẩn liên quan tới GTL chúng ta sẽ đề cập một cách tinh tế tính phức tạp của các tế bào thần kinh, sự đối mặt của vấn đề tiếp cận và đích của các dạng tế bào khi xem xét các chiến lược GTL trong hệ thống thần kinh trung ương. Không giống như các tổ chức khác của cơ thể như gan hay phổi - khi có một khối lượng lớn tổ chức bị hủy hoại thì hậu quả có thể chỉ rất nhỏ hoặc là mất hoàn toàn chức năng ở tổ chức đó. Nhưng ở não bộ thì chỉ cần bị hủy hoại một vùng rất nhỏ cũng đã gây nên sự hủy hoại rất lớn. Việc trị liệu một vùng nhất định trên não hoặc các dạng tế bào là rất khó thành công trong hệ thần kinh trung ương (central nervous system -CNS).

Ngoại trừ các nguyên nhân di truyền của các bệnh thoái hóa thần kinh đã được xác định, tới nay người ta vẫn chưa hiểu rõ những khía cạnh chính của bệnh lý học các bệnh thần kinh. Trong khi các dạng tế bào chính bị tác động trong các bệnh Parkinson, Alzheimer thì đã được xác định thì những yếu tố hoặc những điều kiện chính góp phần vào việc này sinh những thoái hóa thần kinh thì hiện nay vẫn chưa rõ. Vì thế, ở thời điểm này các sản phẩm gen sẽ giúp làm giảm bớt hiệu ứng mất chức năng neuron, bù đắp lại sự chết của các neuron, ức chế sự chết theo chương trình của tế bào -apoptosis hoặc kích lệ sự sống sót của tế bào. Đó là những vấn đề cơ bản trong GTL hệ thần kinh. Khi GTL đã phát triển và có sự chất lượng thì hiệu quả của GTL trong hệ thần kinh sẽ cực kỳ lớn.

Trong chương này chúng ta sẽ đề cập tới những khía cạnh chính của sự mất chức năng thần kinh liên quan tới bệnh, những tiến bộ đầy hứa hẹn trong sự chuyển gen tới hệ thần kinh của các họ vec tơ virus. Và chúng ta cũng chú trọng tới sự chuyển gen tới hệ thần kinh trung ương (HTKTU) đã được thực hiện trên các mô hình động vật. Những đặc trưng quan trọng của sự thử nghiệm lâm sàng với việc sử dụng các tế bào đã công nghệ hóa và các yếu tố dinh dưỡng đối với sự thoái hóa thần kinh v.v.. Cuối cùng chúng ta sẽ vẽ được một bức tranh tổng thể về sự kết hợp giữa di truyền học và sinh học phân tử đối với việc áp dụng GTL ở hệ thần kinh trung ương.

18.1 Hình ảnh bên ngoài của bán cầu đại não. (a) não bộ và tủy sống được bảo vệ bởi nhiều lớp gồm da, xương và mô liên kết đặc biệt. (b) sơ đồ lớp bảo vệ phủ lên não bộ. (c) sự phân chia của não bộ người cắt ngang.

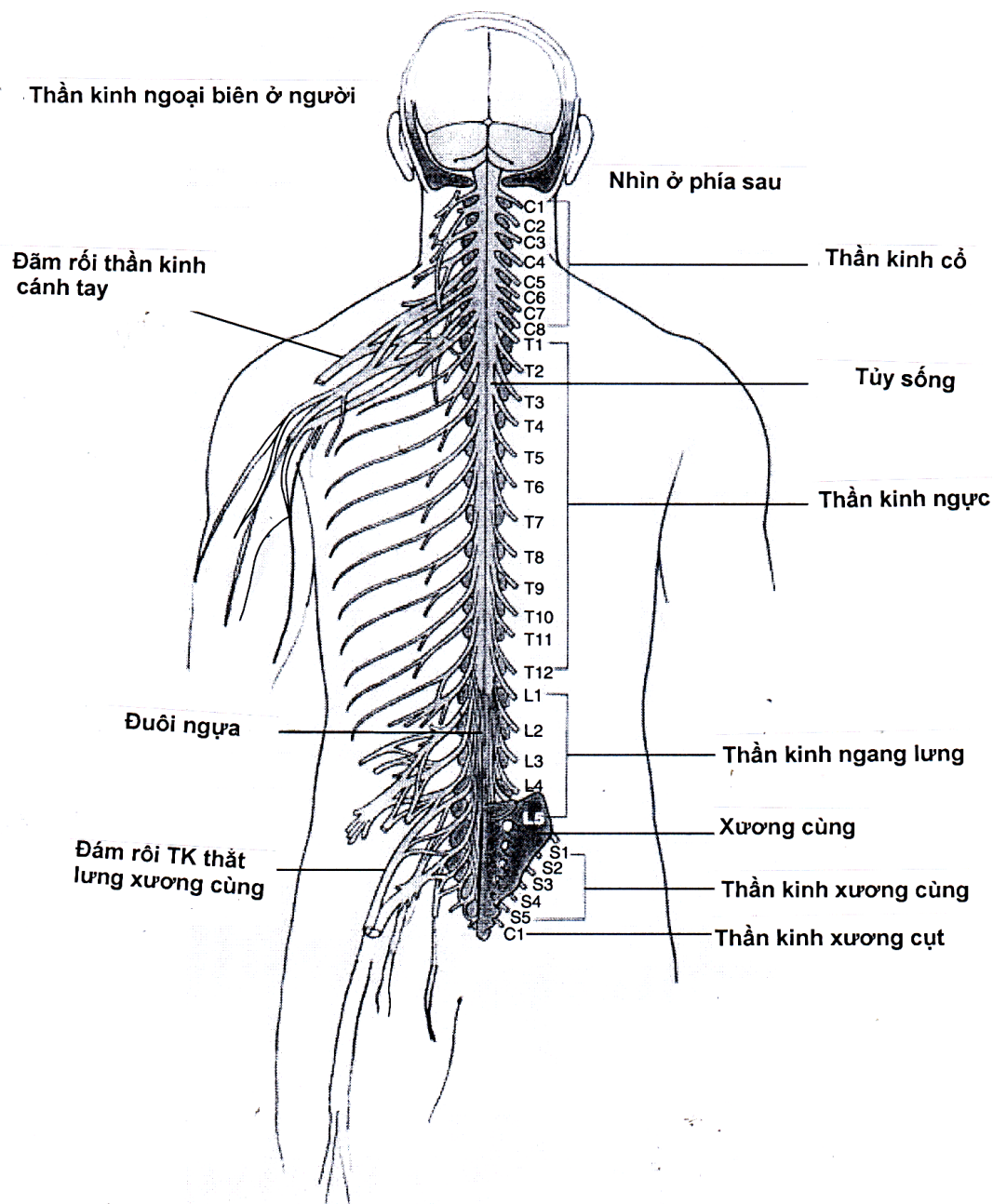
(Theo Laurie C. Doering. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001) (Hình trang sau)



18.2 Sự phức tạp của hệ thần kinh

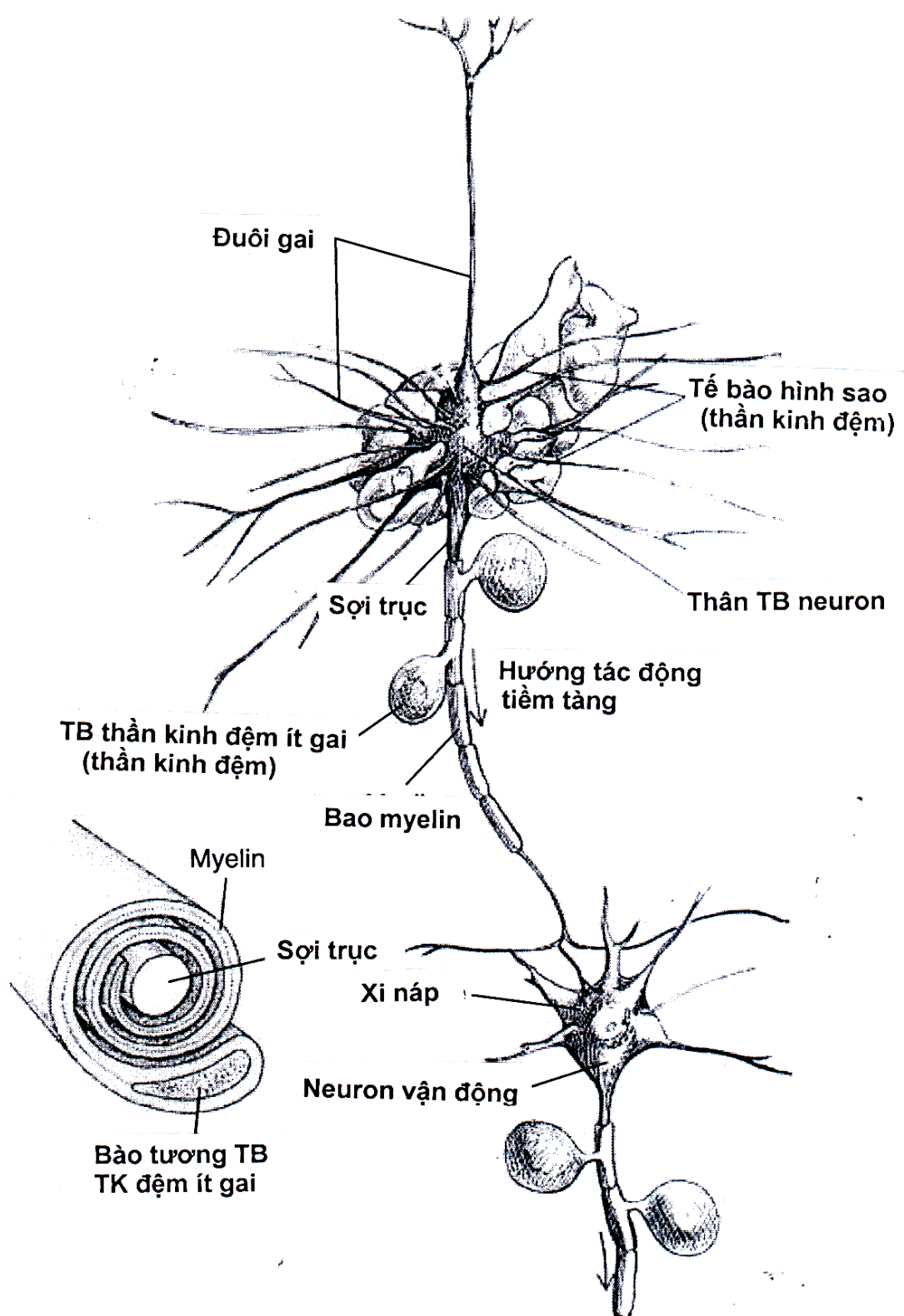
Hệ thần kinh được chia thành 2 phần chính: (1) hệ thần kinh trung ương (CNS) gồm não bộ và tủy sống (spinal cord) và (2) hệ thần kinh ngoại biên (peripheral nervous system – PNS) bao gồm mô thần kinh ở dạng các dây thần kinh đâm ra từ hai bên từ não bộ và tủy sống, giữ liên lạc giữa các mô khác của cơ thể với hệ thần kinh trung ương (Hình 18.2). Nhiều dạng neuron được chuyên hóa làm các nhiệm vụ tiếp nhận, xử lý và truyền thông tin thông qua các xung thần kinh (Hình 18.3), đó là các đáp ứng sơ cấp đặc trưng cho các chức năng của hệ thần kinh. Các neuron có thể được phân biệt bởi kích thước, hình dạng, sự phát triển và tổ chức trong não bộ. Các neuron hoạt động trong mạng lưới và tiết ra các chất dẫn truyền thần kinh (DTTK) và các thông tin hóa học khác ở những vị trí tiếp xúc gọi là xi náp (synapse). Mỗi vùng của màng tế bào trong neuron xi náp trên đều chuyên hóa cho sự tiết nhanh hoặc nhiều chất DTTK. Vùng này liên hệ chặt chẽ với một vùng chuyên hóa trên các tế bào xi náp dưới có chứa các receptor của các chất DTTK hoặc các ligand khác. Khi liên kết các chất DTTK với các receptor thì sẽ phát ra tín hiệu điện thế xi náp trong tế bào xi náp dưới (Hình 18.4). Thông tin trong hệ thần kinh vì thế được chuyển đi và được xử lý bởi các mạng lưới tinh tế để tạo nên hệ thống các tín hiệu hóa học và điện học. Các tế bào thần kinh đệm thường được phó thác như các tế bào trợ giúp chuyên hóa của HTKTƯ, đại diện cho lớp thứ hai của các tế bào giữ chức năng quan trọng đặc biệt đối với sự hoạt động của hệ thần kinh (Hình 18.3).

Có 4 dạng chính của tế bào thần kinh đệm: các tế bào hình sao nói chung có khả năng giúp cho việc duy trì môi trường ngoại bào trong hệ thần kinh. Việc xử lý của tế bào hình sao liên hệ mật thiết với thân tế bào neuron, các tế bào nhánh và các đầu tận thần kinh. Chúng làm nhiệm vụ cách ly và cô lập các con đường và các miền của neuron. Các tế bào ít phân nhánh và các tế bào Schwann tạo nên các bao myelin quanh sợi trục trong HTKTƯ và thần kinh ngoại biên (TKNB). Myelin bao quanh các đoạn của sợi trục để tăng cường sự truyền dẫn các tín hiệu điện tử. Trong HTKTƯ, mỗi tế bào ít phân nhánh có thể hình thành và duy trì bao myelin cho khoảng 60 sợi trục. Trong TKNB, mỗi đoạn sợi trục chỉ có một tế bào Schwann. Các tế bào thần kinh đệm trong HTKTƯ tương tự như các đại thực bào và có thể được hoạt hóa bởi nhiều tình huống bao gồm cả sự viêm nhiễm và chấn thương.

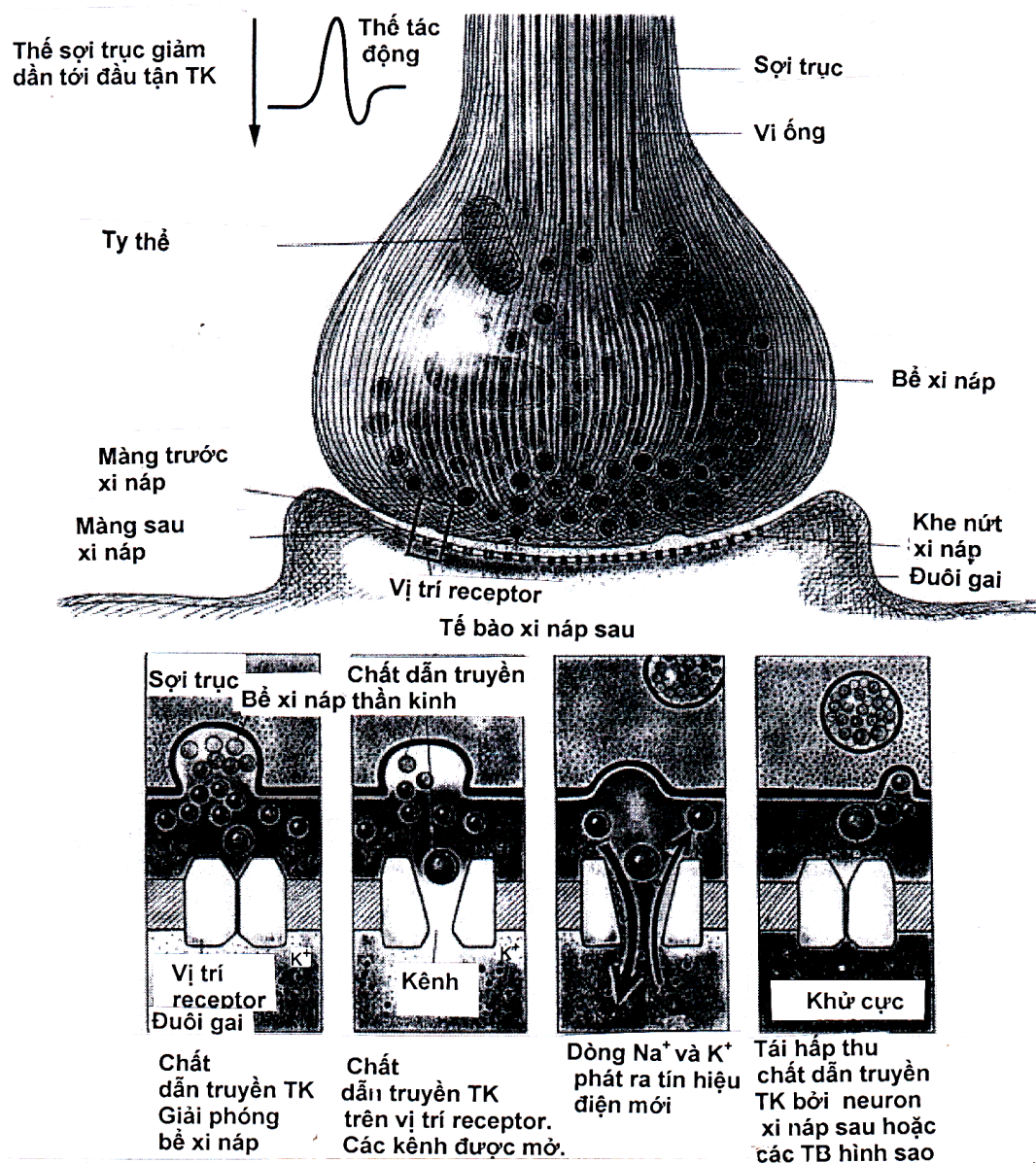


Hình 18.2 Não bộ, tủy sống và các dây thần kinh ngoại biên. Có 31 xương đốt sống ở cột sống đó là ngôi nhà bảo vệ tủy sống. Ở giữa các cột sống là các dây thần kinh ngoại biên được mọc ra từ hai bên. Dây thần kinh của cơ thể được tạo ra bởi các sợi cảm giác và vận động tạo nên sự tác động qua lại giữa các bộ phận ngoại biên của cơ thể với hệ thần kinh trung ương (não bộ và tủy sống). (Theo Laurie C. Doering. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Hình 18.3 Sơ đồ đại diện của một neuron và các tế bào thần kinh đệm. Các neuron được bao quanh bởi các tế bào hình sao, làm đầy các khe hở giữa các thể tế bào neuron. Các tế bào ít phân nhánh bao quanh sợi trục và tạo nên bao myelin. Trong hình chỉ myelin bao xung quanh các đoạn của sợi trục. (Theo Laurie C. 2001) (Hình trang sau)



18.3 Những lệch lạc trong hệ thần kinh



Hình 18.4 Các thành phần của xi náp. Trong hình vẽ minh họa các khía cạnh của sự giải phóng các chất dẫn truyền thần kinh, tương tác receptor, và sự phát sinh các tín hiệu điện tử. Tất cả các tín hiệu điện tử đều này sinh từ sự tác động của các tổ hợp khác nhau của protein kênh ion để hình thành nên các lỗ chứa nước, qua đó các ion đi ngang qua màng. Khi các kênh ion mở, ion được di rời do gradient điện hóa học trong kênh giảm xuống. Sự di chuyển qua màng tạo nên sự thay đổi điện thế màng và sinh ra các tín hiệu điện tử.

(Theo Laurie C. Doering. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Có nhiều dạng neuron và tế bào thần kinh đệm trong hệ thần kinh mà người ta đã nhanh chóng nhận ra rằng tiềm ẩn của mất một số chức năng thần kinh phụ thuộc vào dạng tế bào bị tác động. Thoái hóa thần kinh có thể xảy ra ở những vùng chọn lọc của não bộ và cũng có những sự cố thoái hóa thần kinh tác động tới toàn bộ não bộ (thoái hóa bán cầu não) như trường hợp các bệnh thần kinh do sự tích tụ của lysosome (lysosomal storage diseases – LSD) có liên quan tới các đột biến gen đơn.

Với nhiều bệnh thần kinh, các lớp đặc biệt của các neuron ở não bộ hoặc tủy sống là dễ bị tổn thương nhất. Tùy thuộc vào dạng neuron/sự tác động của các chất ĐTTK mà nó có thể xảy ra những thay đổi về hành vi, trí nhớ hoặc vận động. Trong bệnh Parkinson, các neuron định vị trong chất xám của não giữa có chứa chất ĐTTK dopamine, khi bị tích tụ lại sẽ gây chết tế bào. Khi mất các neuron này sẽ ảnh hưởng tới chức năng bình thường của hệ ngoài bó tháp ở não bộ và kết quả là chân tay bị co cứng và run rẩy. Còn trong bệnh Alzheimer thì lại xảy ra ở vùng hải mã (hippocampus) và các vùng vỏ não do chết các neuron giàu acetylcholine, gây nên sự sa sút trí tuệ, ngăn cản sự hình thành mới của trí nhớ. Bệnh teo cơ xơ cứng cột bên (amyotrophic lateral sclerosis –ALS) thì do sự hủy hoại của các neuron vận động trong HTKTƯ và gây nên sự nhu nhược và co cứng cơ. Còn trong trường hợp đa xơ cứng, khi các tế bào ít phân nhánh trong hệ thần kinh trung ương bị tác động thì các chức năng vận động hàng ngày cũng như các giác quan bị sa sút đáng kể.

Teo cơ xơ cứng cột bên là một bệnh di truyền do các đột biến ở các gen mã cho các protein có liên quan đến sự thoái hóa các thành phần bình thường của cơ thể như lipid, protein và carbohydrate. Mặc dầu hầu hết các bệnh thuộc lysosome là do sự khiếm khuyết trong các gen mã cho các enzyme của lysosome, nhưng cũng có một số trường hợp lại gây nên bởi các gen mã cho các protein vận chuyển, protein bảo vệ hoặc các enzyme xử lý enzyme của lysosome. Trong trường hợp bệnh do tích tụ lysosome thì hiếm khi xảy ra và tỷ lệ chỉ là 1/5000 sơ sinh. Sự tích tụ cơ chất enzyme này trong các tế bào của HTKTƯ đặc trưng cho các bệnh giống như mucopolysaccharidose hoặc GM, gangliosidosis. Sự chết của tế bào xảy ra như thế nào trong hệ thần kinh? Trong một số trường hợp các nguyên nhân di truyền có liên quan tới sự thoái hóa thần kinh. Như trường hợp bệnh Huntington, một đột biến lặp chập ba (triplet repeat mutation) ở NST số 4 có liên quan tới sự chết của các neuron ở một vùng của não bộ gọi là đuôi/hạch (caudate/putamen), một phức hợp các cấu trúc thông nhau, điều chỉnh sự điều hòa của các hoạt động vận động. Việc xác định được các đột biến lặp chập ba không ổn định là một trong các phát hiện lớn về di truyền học thần kinh người. Chúng ta sẽ bàn về vấn đề này trong các bệnh Alzheimer và Parkinson.

Người ta đã xác định được nhiều dạng khác nhau của các biến đổi phân tử và tế bào học trong các neuron có liên quan tới sự chết của các neuron. Các nhà nghiên cứu đã xác định được nhiều biến đổi đặc hiệu trong neuron ở các rủi ro có liên quan tới các bệnh ở HTKTƯ đang thịnh hành cũng như các bệnh của tuổi già. Sự tích tụ bất thường của các sợi nhỏ và các protein đã bị biến đổi là những đặc trưng trước tiên của các neuron bị mất chức năng thần kinh. Sự tích tụ này có thể xảy ra ở tế bào chất của neuron hoặc ở môi trường ngoại bào. Trong một số trường hợp nhất định người ta đã xác định được số neuron đã bị mất mát mà bệnh Alzheimer là một ví dụ. Rõ ràng là tất cả các dưới nhóm neuron bị mất trong bệnh Alzheimer đều gắn với vùng vỏ não, ở đó có hình thành các tằm

thần kinh bị viêm và các mảng xoắn lại của các thành phần khung tế bào trong các neuron vì vậy mà gây nên sự rối loạn các dây thần kinh.

Vậy làm thế nào để chặn lại những biến đổi khởi đầu ở các neuron mà có thể dẫn đến sự chết hàng loạt của các tế bào ở các vùng đặc biệt của hệ thần kinh ? Có nhiều cơ chế phân tử với các mức độ khác nhau đã được xác định. Đó là những biến đổi về bộ khung tế bào, tổn thương oxy hóa, những biến đổi của DNA, những biến đổi của RNA trong tổng hợp protein, sự tích tụ các protein bất thường, các gốc tự do có độc tính, giảm sự vận chuyển của sợi trục và sự chết theo chương trình của tế bào – đó là những lý do có thể sinh ra các bệnh thần kinh. Trên một số mô hình trên động vật người ta đã tạo được những biến đổi phân tử này và đến lượt mình, chúng lại giúp cho việc xác định bệnh lý học của sự thoái hóa thần kinh và lập nên cách thử nghiệm chiến lược GTL đối với các bệnh của hệ thần kinh trung ương và các bệnh tuổi già.

18.4 Các yếu tố dinh dưỡng thần kinh và gen trị liệu

18.4.1 Các yếu tố dinh dưỡng thần kinh

Có nhiều phân tử trong hệ thần kinh giữ vai trò rất quan trọng đối với sự tồn tại, biệt hóa và duy trì neuron trong hệ thần kinh trung ương cũng như ngoại biên. Những phân tử này chính là các yếu tố dinh dưỡng thần kinh (DDTK) (Bảng 18.1), chúng gây cảm ứng, hình thành các xi náp và tạo nên sự chuyên hóa cao cho mạng lưới neuron trong não bộ. Các yếu tố này được tiết ra từ các đích được kích thích bởi các neuron ở các đầu tận thần kinh, sau đó chuyển qua một khoảng dài rồi tới thân tế bào, ở đó chúng tác động làm điều hòa chức năng neuron bằng nhiều cơ chế tín hiệu (Hình 18.5). Hiện nay người ta đã biết các yếu tố DDTK này gắn vào các protein receptor bề mặt tế bào ở các đầu tận thần kinh, rồi hòa nhập với nhau (nhờ endocytosis qua trung gian receptor) sau đó di chuyển tới thân tế bào theo cơ chế vận chuyển sợi trục thụt lùi. Tìm hiểu sâu hơn về cấu trúc receptor của các yếu tố DDTK cho thấy chúng cũng tương tự như các receptor yếu tố tăng trưởng truyền thống và các cytokine. Sự biểu hiện của các receptor yếu tố DDTK là đặc hiệu và nổi trội trong hệ thần kinh, khi hoạt hóa các yếu tố này sẽ có tác động phân tử một cách phân biệt.

Yếu tố tăng trưởng thần kinh (nerve growth factor –NGF) nguyên bản là thành viên của các neurotrophin – một họ protein có cấu trúc thông thường. Yếu tố này được phát hiện và xác định đặc tính từ những năm 1950 bởi Rita Levi – montalcini, Stanley Cohen và Viktor Hamburger và là phân tử đầu tiên thể hiện có hoạt tính thúc đẩy tăng trưởng thần kinh tiềm tàng trên các vật phẩm mô thần kinh nuôi cấy. Từ khi phát hiện ra NGF, nhiều phân tử mới đã được xác định và bổ sung thêm vào danh sách nhóm các chất dưới cái tên là yếu tố DDTK đã được ghi ở Bảng 18.1. Các đáp ứng với neurotrophin chắc là qua trung gian receptor tyrosine kinase thuộc họ *trk* (các gen tiền ung thư).

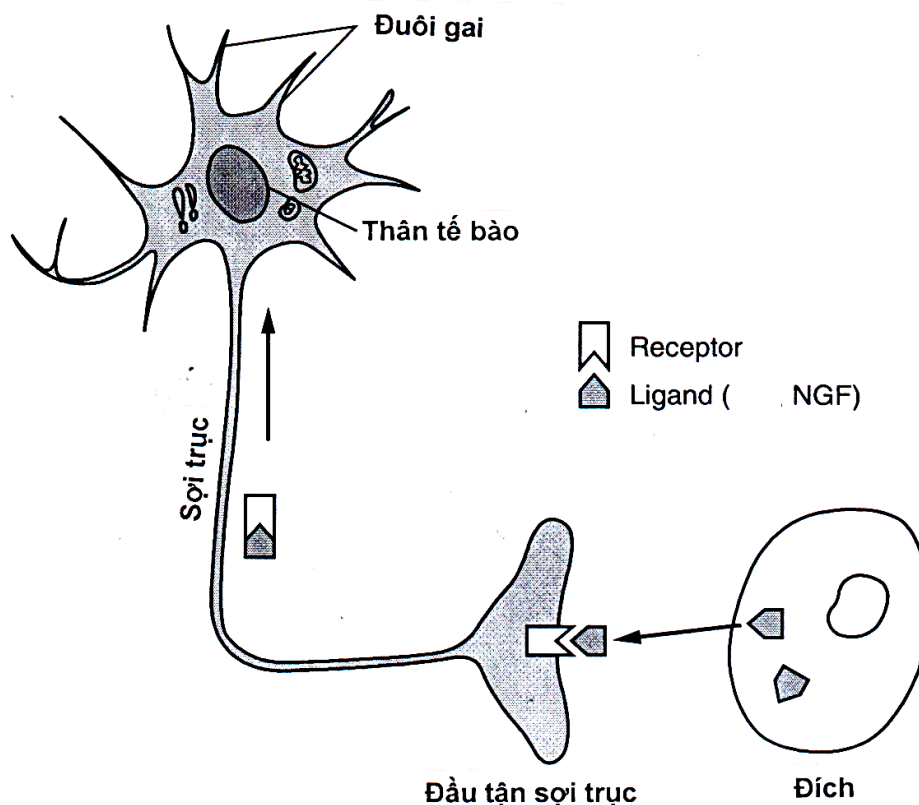
Cho tới nay, rõ ràng là các yếu tố DDTK có thể được tạo ra từ nhiều nguồn, bao gồm các tế bào thần kinh đệm, các quá trình hướng tâm của các neuron, cơ và ngay cả chất nền ngoại bào. Nhiều sự kiện sinh học gồm sự tăng trưởng thần kinh, sự biểu hiện kiểu hình (chất DTTK - neurotransmitter) và sự chết theo chương trình của tế bào v.v.. đều liên quan tới sự báo hiệu thụt lùi của các yếu tố DDTK. Vì thế, có nhiều khả năng khai thác hiệu ứng GTL các yếu tố DDTK đối với sự tồn tại của các tế bào thần kinh và khả năng điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh nói chung.

Bảng 18.1 Danh mục các yếu tố dinh dưỡng thần kinh thông thường

Lớp	Thành viên	Receptor	Neuron đáp ứng
Neurotrophin	NGF	TrkA	Neuron tiết acetylcholine của não trước
	NT-3	TrkC	Neuron thuộc vỏ não-tủy sống
	NT-4/5	TrkB	Đuôi/hạch
	BDNF	TrkB	Chất xám
Yếu tố tăng trưởng biến nạp β	GDNF	Ret	Neuron chất xám
	TGF- β		Neuron vận động
Cytokine	CNTF	CNTF β	Neuron vận động tủy sống
	LIF	gp130/JAK	Neuron vận động tủy sống
		LIFR β /TYK	
Yếu tố tăng trưởng giống insulin	IGF-1	Receptor IGF	Neuron tiết acetylcholine của não trước
		IGF-2	Neuron tiết acetylcholine của não trước
Yếu tố tăng trưởng Nguyên bào sợi	bFGF	Receptor FGF	Neuron tiết acetylcholine của não trước
		aFGF	Neuron vận động tủy sống

Từ những nghiên cứu cơ bản này chúng ta hiểu được rằng nếu não bộ bị thương tổn thì những phân tử này sẽ được giải phóng và giữ vai trò quan trọng trong quá trình hồi phục. Ngoài việc làm giới hạn lại sự mất mát các neuron, các yếu tố DDTK còn có thể kích thích các mầm mới trên sợi trục và các sợi nhánh, điều hòa sự phân nhánh của sợi trục, điều hòa hòa tổng hợp các chất DDTK và ảnh hưởng tới sự hình thành xi náp. Đặc tính có thể di truyền này của sự thay đổi cấu trúc và chức năng của neuron trong đáp ứng với các tín hiệu môi trường (giống như giải phóng yếu tố DDTK) là phản ánh tính mềm dẻo của hệ thần kinh. Nhiều yếu tố có hiệu ứng gối lên nhau (chủ yếu đối với sự tăng trưởng và tồn tại) ở hệ thần kinh trung ương cũng như ngoại biên. Ngày nay người ta biết rõ ràng là bất kỳ dạng neuron của thần kinh trung ương hay ngoại biên cũng đều cần có sự tổ hợp các yếu tố DDTK thì mới đạt được mức tối ưu về chức năng và khả năng tồn tại của chúng. Vì thế cần phải quan tâm tới việc tổ hợp hiệu ứng của rất nhiều yếu tố đối với các bệnh thần kinh. Như đã đề cập ở các chương trước về tính logic của các yếu tố DDTK, tuy nhiên việc làm cân bằng chúng để đề phòng các rủi ro của các tác dụng phụ vẫn là những vấn đề đối mặt trong nhiều thử nghiệm lâm sàng.

Việc nhận dạng và xác định đặc tính của mỗi phân tử DDTK đã được thực hiện ở những chuột chuyển gen (knock-out) không tạo các yếu tố đó hoặc có liên kết các thành phần receptor nhằm tìm được chức năng sinh lý học của các phân tử này cũng như đánh giá được sự đóng góp của chúng vào việc tồn tại của các dạng neuron khác nhau. Tuy vậy, chúng ta vẫn chưa hiểu rõ liệu sự khiếm khuyết gen DDTK có liên quan gì với việc mất chức năng DDTK hay không?



Hình 18.5 Tín hiệu thụ lùi bởi các yếu tố dinh dưỡng thần kinh. Ligand yếu tố DDTK (được cung cấp bởi mô đích) gắn với receptor trên bề mặt các đầu tận của sợi trục. Phức hợp ligand-receptor này sau đó được chuyển dọc theo sợi trục tới thân tế bào. Các tín hiệu dinh dưỡng thụ lùi sẽ điều hòa sự tăng trưởng thần kinh, sự tồn tại, sự chết và sự biểu hiện của các chất dẫn truyền thần kinh.

(Theo Laurie C. Doering. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Nhiều nghiên cứu quy mô đang tập trung vào các hiệu ứng có lợi của việc chuyển giao các yếu tố DDTK trong các mô hình động vật và các nghiên cứu này đã đặt cơ sở cho nhiều thử nghiệm lâm sàng. Sự lan rộng hủy hoại thần kinh, nồng độ của các yếu tố DDTK và thời điểm mà các yếu tố này được giải phóng - đó là các thông số quan trọng liên quan tới hiệu ứng của các phân tử này nhằm cứu vớt các neuron khỏi bị chết. Cũng cần phải nhận thức được rằng vai trò thật sự của các yếu tố DDTK và tiềm năng trị liệu của chúng đối với các bệnh thoái hóa thần kinh thì vẫn cần phải được sáng tỏ.

18.4.2 Các mô hình động vật GTL về sự thoái hóa thần kinh

Hiện tại, những sáng kiến về GTL hệ thần kinh trung ương cho phép tiếp cận cả *in vivo* và *ex vivo*. Các vec tơ virus hiện nay là phương tiện thông thường nhất để chuyển gen tới các tế bào thần kinh trung ương (CNS). Các phương pháp *in vivo* đưa trực tiếp virus vào trong hệ thần kinh. Theo cách này, các vec tơ virus sẽ được tiêm vào những vị trí đặc biệt trên não bộ và tủy sống. Trong trường hợp chuyển gen *ex vivo* thì các gen mới trước tiên được đưa vào các tế bào trong môi trường nuôi cấy, sau đó các tế bào được cấy ghép lập thể vào những vùng mong muốn của hệ thần kinh.

Một khi GTL vẫn đang có những nỗ lực vượt bậc thì danh sách các hệ virus cũng không ngừng được mở rộng. Các dạng virus và các tế bào được sử dụng cho việc chuyển gen trong hệ thần kinh được trình bày ở (Hình 18.6). Hiện nay các vec tơ virus và các tế bào khi sử dụng với một sự kết hợp nào đó đã mang lại những hứa hẹn và những lợi ích thực sự hơn là việc thay thế tế bào và gen như đã được ứng dụng vài năm trước đây. Khi mỗi yếu tố DDTK đã được xác định thì các tế bào công nghệ hóa tiết ra các yếu tố này sẽ được làm test trên các mô hình động vật về hiệu ứng tồn tại của neuron cũng như các khả năng hoạt động của nó (Bảng 18.2). Một số mô hình GTL lâm sàng nổi bật ở đây đều tập trung đặc biệt tới các vec tơ và các tế bào dùng để chuyển gen vào hệ thần kinh trung ương. Chúng ta hãy quan sát một số ví dụ về GTL trên các mô hình động vật với các bệnh thoái hóa thần kinh.

Trên mô hình động vật bệnh Alzheimer người ta thấy hiện tượng mất các neuron tiết acetylcholine và hình thành các tấm làm rối các sợi thần kinh hoặc sản sinh các protein tiền thân của sự hóa bột (amyloid). Trên các động vật có vú thì thấy có sự cắt ngang đường vòm-tua (fimbria-fornix pathway) (nối giữa hải mã và vách ngăn giữa) làm chết rất nhiều (khoảng 50%) neuron tiết acetylcholine trong vách ngăn giữa, đồng thời mất cung cấp acetylcholine cho việc tạo hải mã. Nếu một neurotrophin (NGF) được đưa vào thì việc mất neuron cảm ứng ở vùng cắt ngang vách ngăn giữa /não trước có thể được giảm thiểu. Trong mô hình động vật liên quan tới giảm trí nhớ do tuổi tác, khi được truyền NGF thì trí nhớ của động vật cũng được cải thiện phần nào.

Khả năng cung ứng một yếu tố DDTK cho não thông qua các tế bào công nghệ hóa lần đầu tiên được chứng minh bởi Fred Gage và cộng sự., 1988. Các nhà nghiên cứu đã dùng tế bào nguyên bào sợi chuột (208F) đã được cải biến với một retrovirus để có thể tổng hợp và tiết ra NGF. Các nguyên bào sợi này sẽ được cấy vào não chuột có tổn thương vòm-tua. Kết quả cho thấy, các nguyên bào sợi công nghệ hóa đã tạo ra đủ NGF hoạt hóa để có thể cứu được trên 90% neuron tiết acetylcholine không bị chết. Công trình này cho thấy GTL *ex vivo* với HTKTƯ là khả thi. Hiệu ứng bảo vệ thần kinh tương tự như các neuron tiết acetylcholine vách ngăn giữa cũng thấy ở các nguyên bào sợi sơ cấp, các tế bào thận chuột lang mới sinh (baby hamster kidney –BHK) và các tế bào thần kinh đã được công nghệ hóa đầy đủ để tổng hợp được NGF.

Ngoài GTL với các yếu tố DDTK, các chiến lược sử dụng promoter điều hòa sự chết của tế bào cũng đã được kiểm nghiệm. Các yếu tố kháng apoptosis như Bel-xL là một trong 3 đồng dạng của Bel-x bảo vệ tế bào khỏi hiệu ứng bị hủy hoại bởi các oxy hoạt hóa. Các yếu tố kháng apoptosis này đang được xác định bởi GTL ở các mô hình động vật về thoái hóa thần kinh.

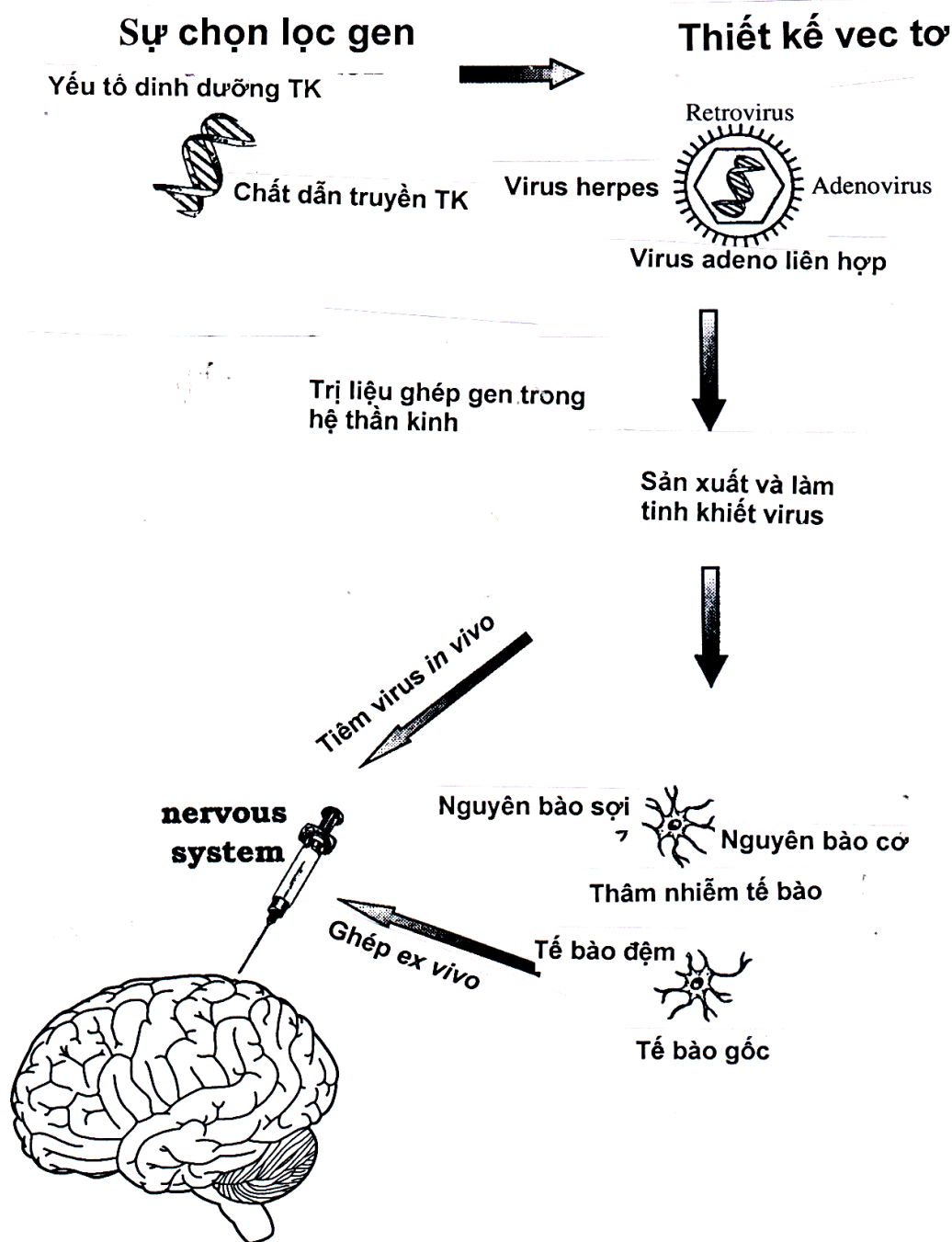
Mô hình phổ thông nhất của Parkinson là mô hình trên chuột. Khi tiêm vào não bộ catecholamine neurotoxin 6- hydroxydopamine (6-OHDA) thì neurotoxin này đã phá hủy các sợi dopamine nằm ở vùng chất xám - hệ vận. Việc xử lý này đã làm mất dopamine và tạo nên các hành vi bất thường ở động vật, khi chúng được nhận chất chủ vận dopamine

(amphetamine hoặc apomorphine) thì hoạt hóa lại được các receptor dopamine. Tình trạng này cũng có thể được giảm nhẹ khi enzyme tyrosine hydroxylase (enzyme giới hạn tốc độ sản xuất dopamine) được tạo ra ở các neuron trong hệ vân (striatum). Những thí nghiệm GTL *ex vivo* với Parlinson đã sử dụng các dòng tế bào nguyên bào sợi đã cải biến gen trong nuôi cấy để biểu hiện gen tyrosine hydroxylase. Trong trường hợp này, chức năng của các nguyên bào sợi cấy ghép được kiểm chứng bằng sự giảm các hành vi bất thường (circling behavior) ở chuột được cấy ghép. Ngoài nguyên bào sợi, các nguyên bào cơ sơ cấp và nhiều dòng tế bào khác cũng đã được cải biến để tổng hợp được tyrosine hydroxylase và làm giảm sự suy yếu về hành vi trong mô hình chuột bị tổn thương 6-OHDA. Cũng cần phải chỉ rõ rằng các nguyên bào sợi cũng như các dạng tế bào khác không phải neuron tuy không liên quan gì với dòng điện của não bộ nhưng vẫn tạo được các hiệu ứng chức năng đủ mạnh khi sản xuất các sản phẩm gen chuyển. Hạn chế trước tiên khi sử dụng các dòng tế bào nguyên bào sợi là tăng liên tục khối lượng nguyên bào sợi ở não. Để tránh hình thành các khối u bởi các dòng tế bào này người ta đã bọc (làm nang) các tế bào với các chất liệu cho phép trao đổi các sản phẩm gen chuyển giữa các tế bào và mô của vật chủ. Bước tiến quan trọng là các tế bào sơ cấp, các tế bào gốc và các dòng tế bào có thể cấy được vào hệ thần kinh.

Mặc dầu chúng ta vẫn chưa hiểu tại sao các neuron chứa dopamine lại bị chết nhiều ở các bệnh nhân Parkinson, nhưng rõ ràng các yếu tố DDTK đã kéo dài sự tồn tại và khả năng của các neuron dopamine này. Đó là tiêu điểm chú ý của GTL với hy vọng có thể ngăn ngừa được sự chết của các neuron. Các yếu tố hứa hẹn bao gồm yếu tố DDTK từ não (brain-derived neurotrophic factor –BDNF), yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (fibroblast growth factor –FGF) và yếu tố DDTK từ dòng tế bào thần kinh đệm (glial cell-line-derived neurotrophic factor –GDNF). Những yếu tố này bảo vệ tốt các neuron tiết dopamine. Trong mô hình Parkinson trên động vật thì các nguyên bào sợi sơ cấp và các dòng tế bào nguyên bào sợi đã công nghệ hóa dùng để chuyển yếu tố DDTK từ não (BDNF) sẽ phòng được sự thoái hóa các neuron dopamine. Trong trường hợp này, BDNF được hoạt hóa bởi rất nhiều tín hiệu phân tử do đó ngăn ngừa được sự chết của neuron.

Bảng 18.2 Mô hình nghiên cứu các bệnh thần kinh ở chuột

Bệnh	Mô hình	Dạng tế bào bị tác động chính	Yếu tố DDTK liên quan tới sự sống sót	Mô hình trên chuột chuyển gen
Parkinson	Tiêm 6-OHDA	Neuron dopamine	BDNF, GDNF	NURR 1
Alzheimer	Con đường cắt ngang tua-vòm	Neuron tiết choline	NGF, NT4/5	APP
Huntington	Tiêm exitotoxyn (acid kainic)	Neuron tiết GABA	BDNF, NT4/4, CNTF	Lặp CAG
ALS	Tiêm IDPN	Neuron vận động	BDNF, CNTF	SOD1
MS	EAE	Các tế bào ít	CNTF, IL-6	2-5 MBP



Hình 18.6 Các virus và các dạng tế bào dùng trong trị liệu ghép gen thực nghiệm trong hệ thần kinh. (Theo Laurie C. Doering. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

GDNF là thành viên của họ các yếu tố tăng trưởng biến nạp (TGF- β) – một nhóm cytokine lớn giữ vai trò quan trọng trong việc kiểm soát sự tăng sinh, sự di chuyển và sự tạo hình của tế bào. Phân tử này được Leu – Fen Lin phát hiện tại phòng thí nghiệm của Frank Collin khi phân tích phần dịch nổi nuôi cấy dòng tế bào thần kinh đệm năm 1953, nó có hiệu ứng tiềm ẩn đối với sự tồn tại của các neuron dopamine. Các vec tơ adenovirus khiếm khuyết sao chép mã cho GDNF có thể làm giảm cảm ứng thực nghiệm hành vi quay vòng (rotational behavior) khi tiêm 6-OHDA vào chuột trên mô hình Parkinson. Các vec tơ adenovirus này sử dụng promoter của virus Rous sarcoma (RSV) để kiểm soát gen chuyển GDNF. Tuy nhiên, sau một tháng lại thấy có sự giảm đáng kể mức độ biểu hiện gen chuyển, các phản ứng miễn dịch của vật chủ đối với adenovirus và sự điều hòa xuống của các promoter virus - đó là các vấn đề thường thấy khi tiêm adenovirus vào não. Vec tơ adenovirus các thế hệ kế tiếp đã được thiết kế nhằm giảm thiểu tối đa các phản ứng miễn dịch và nới rộng sự biểu hiện gen. Cũng giống như các yếu tố DDTK khác, GDNF hiện nay có hiệu ứng được lý trên rất nhiều neuron. Nó là yếu tố quan trọng đối với các neuron vận động ở tủy sống và các neuron Purkinje ở não bộ.

Một kỹ thuật khác để phòng ngừa sự thoái hóa thần kinh là ghép các tế bào trợ giúp với neuron thai nhi. Trong trường hợp này người ta muốn ám chỉ một chiến lược đồng ghép, các tế bào trợ giúp sẽ tạo điều kiện cho sự sống sót của các neuron được cấy ghép. Các nguyên bào sợi cải biến sẽ cung ứng cục bộ FGF giúp duy trì sự cấy ghép của các neuron dopamine thai nhi. Các nguyên bào sợi chẳng những giúp cho việc duy trì quần thể neuron cấy ghép mà còn làm giảm sự cần thiết phải có một số lượng lớn các tế bào thai nhi lấy ra từ phẫu thuật não phôi thai.

Trong việc xem xét bệnh Huntington, các nguyên bào sợi người được nang hóa tạo nên các yếu tố DDTK lông tiết (secrete ciliary neurotrophic factor –CNTF) có thể ngăn ngừa được những khiếm khuyết hành vi và sự thoái hóa thể vận ở mô hình bệnh Huntington trên chuột. GTL thực nghiệm bệnh Huntington cũng đã được thực hiện trên mô hình khỉ. Ở đây khi được tiêm acid quinolinic thấy có biểu hiện hình ảnh thoái hóa thần kinh đặc trưng cho bệnh Huntington. Các nhà nghiên cứu trị liệu tế bào ở Rhode Island đã công nghệ hóa nguyên bào sợi thận chuột lang mới sinh để tiết CNTF rồi sau đó đưa kèm cả các tế bào vào trong các nang polymer trước khi cấy vào thể vận. Khi nang có chứa các nguyên bào sợi đã được cải biến được ghép vào khỉ trong mô hình bệnh Huntington thì đã sản xuất CNTF bảo vệ được một số quần thể tế bào, bao gồm các neuron tiết GABA và acetylcholine thoát khỏi sự chết. Cần phải lưu ý rằng các vec tơ phải được thiết kế sao cho loại trừ được các gen virus để tránh hiệu ứng độc tế bào và hiệu ứng miễn dịch. Tuy nhiên, việc loại trừ các gen này thường lại làm giảm hiệu ứng và thời gian biểu hiện của gen chuyển. Kiểm soát sản phẩm gen sẽ là một khía cạnh đặc biệt quan trọng đối với sự thành công của GTL ở hệ thần kinh trung ương. Đã có rất nhiều nỗ lực trong việc phát triển các yếu tố điều hòa gen để có thể biểu hiện (không gian) đặc hiệu tế bào và/hoặc (thời gian) phụ thuộc thuốc của gen trị liệu mong muốn. Các yếu tố điều hòa/promoter gen chuyển tiềm năng sẽ hướng dẫn sự biểu hiện các neuron bao gồm các tiểu đơn vị của các sợi thần kinh, β -tubulin, enolase đặc hiệu neuron và tyrosine hydroxylase. Promoter của protein acid các sợi thần kinh đệm và protein kiểm myelin đã được thiết lập để hướng sự biểu hiện gen chuyển trong các tế bào hình sao và các tế bào ít phân nhánh. Hệ thống

gen chuyển (theo hiệu ứng thời gian) có thể cảm ứng được, thường tetracycline hoặc các dẫn xuất của tetracycline được coi như các promoter đối chứng. Về sự kiểm soát phiên mã của tyrosine hydroxylase trong các tế bào tổ tiên thần kinh cũng như nhiều dòng tế bào khác thì nhiều gen và CNTF đã được cảm ứng bởi hệ tetracycline. Khả năng kiểm soát các yếu tố di truyền và mức độ biểu hiện của gen chuyển mới thông qua các hiệu ứng được lý như tetracycline là rất quan trọng trong việc xem xét các quy trình kỹ thuật có liên quan tới việc chuyển các yếu tố DDTK và các chất DTTK trong GTL ở hệ thần kinh.

18.4.3 Khai thác các đặc tính của HIV trong việc chuyển gen trong hệ thần kinh trung ương

Sức mạnh và tiềm năng của các kỹ thuật sinh học phân tử đã được minh họa thông qua việc kiến tạo các vec tơ cơ sở virus rất nguy hại như HIV-1 nhưng lại rất hữu ích trong việc chuyển gen. Các neuron cư trú trong hệ thần kinh ở dạng không phân chia vì thế các vec tơ virus tiềm năng cho GTL phải có khả năng thâm nhiễm được các tế bào sau nguyên phân. Một phương pháp được phát triển bởi Inder Verma, Luigi Naldini và Didier Trono ở Salk Institute in La Jolla, California đã nắm lấy lợi thế của các yếu tố hệ gen HIV để tạo nên các virus tái tổ hợp có khả năng thâm nhiễm các tế bào không phân chia, kể cả các neuron. Virus HIV là một lentivirus thuộc họ retrovirus mà các đặc trưng của chúng đã được biết rõ. Lentivirus (theo từ Latin *lentus* có nghĩa là chậm) gây nên các bệnh thoái hóa tiến triển và mạn tính chậm đối với các neuron, hệ thống tạo huyết, hệ cơ xương và hệ miễn dịch.

Lentivirus có các hệ thống điều hòa gen mạnh và tổ hợp promoter – chất hoạt chuyển (các lặp tận dài - long terminal repeats – LTR), HIV-1 *tat* - LTR là tổ hợp mạnh nhất được biết. Những virus này chỉ là những retrovirus có khả năng hợp nhất vào NST của các tế bào không có hoạt tính phân bào. Chúng đã bị tước bỏ khả năng tái sinh, nhưng những thành phần “nhập khẩu” từ nhân HIV sẽ hướng sự hợp nhất của các gen mới vào trong nhân của các tế bào bị thâm nhiễm. Các trình tự gen của HIV kiểm soát sự hợp nhất trong các tế bào đích cộng với các yếu tố từ 2 plasmid virus khác đã được sử dụng để tạo nên các vec tơ virus hiệu ứng cao hướng sự biểu hiện gen mới được ổn định và dài hạn. Hiệu ứng của sự chuyển gen là cao, khi tiêm các lentivirus vào não chuột trưởng thành thì tải nạp ổn định các tế bào đã biệt hóa tận cùng *in vivo* mà không làm giảm sự biểu hiện gen chuyển hoặc gây độc tính tế bào ít nhất 6 tháng. Hơn nữa, khi tiêm các vec tơ dẫn xuất từ HIV vào hệ thần kinh lại không gây các đáp ứng miễn dịch hay viêm nhiễm nào đáng kể. Khả năng thiết kế các vec tơ virus cơ sở HIV để chuyển gen ổn định và hiệu quả vào trong các tế bào không phân chia là một bước quan trọng để nâng cao khả năng áp dụng các vec tơ retrovirus trong GTL trên người.

18.4.4 Sự chết theo chương trình của các tế bào và sự thoái hóa thần kinh

Sự chết theo chương trình của tế bào (programmed cell death –PCD) muốn nhắm vào apoptosis xảy ra trong quá trình phát triển của tất cả động vật. Đó là một quá trình mà ở đó các tế bào được cài sẵn một chương trình chết thực thụ. Gần đây người ta tập trung vào vấn đề tăng tỷ lệ PCD trong các bệnh thần kinh chủ chốt. Mặc dầu vẫn chưa có bằng chứng nào để khẳng định rằng PCD có liên quan tới sự chết của các neuron và các tế bào thần kinh đệm. Người ta cũng biết rằng có nhiều gen thúc đẩy PCD, những gen này và các

sản phẩm của chúng có sự tương hợp trong thế giới động vật từ giun tròn tới động vật cao cấp. Các sản phẩm của họ *Bel-2* các tiền gen ung thư đã được xác định đặc tính như các protein điều hòa sự chết của tế bào. Một cách tiếp cận trị liệu tránh sự thoái hóa thần kinh có thể được thực hiện thông qua việc điều hòa apoptosis bởi các thành viên của họ *Bel-2* bao gồm *bel-xl* và *bax*. Trong bệnh Alzheimer mức protein Bel-2 cao hơn đáng kể ở những người già và protein này hoạt hóa các tế bào hình sao hơn là các neuron.

Sự biểu hiện quá mức bel-2 trong mô hình chuột chuyển gen superoxyde dimutase (SOD) của ALS đã làm trì hoãn sự tấn công đối với các bệnh thuộc neuron vận động nhưng lại không tác động tới sự kéo dài của bệnh. *Bel-2* có bản chất kháng oxy hóa rất mạnh, vì vậy sự biểu hiện vượt mức *Bel-2* sẽ có thể ngăn ngừa được sự thoái hóa của các neuron vận động do ức chế sự hủy hoại bởi các gốc tự do. Các nghiên cứu dạng này đã chứng minh khả năng GTL của *Bel-2* đối với bệnh xơ cứng cột bên teo cơ (ALS). Tuy nhiên, những thí nghiệm này cũng chỉ rõ rằng việc xử lý nên được thực hiện trước khi xuất hiện các triệu chứng lâm sàng rõ rệt.

Sự sống sót ít ỏi của các neuron cấy ghép là một vấn đề nổi cộm trong ghép neuron. Để tăng sự sống sót của các neuron cấy ghép người ta đã cho biểu hiện gen *Bel-2* trước khi cấy ghép. Ý tưởng này đã được test với dòng tế bào được tạo ra từ vùng chất xám. Khi dòng tế bào này biểu hiện quá mức protein Bel-2 trong thể vân chuột được xử lý với 6-OHDA thì đã cải thiện được các hành vi trên chuột (giảm vòng quay cảm ứng apomorphine).

Trong mô hình tổn thương tua –vòm ở chuột thoái hóa neuron tiết acetylcholine, hiệu ứng bảo vệ là do gen *Bel-xL*. Sự biểu hiện của Bel-xL bởi các vec tơ lentivirus trong mô hình này đã làm tăng đáng kể sự sống sót của các neuron tiết acetylcholine.

Mới đây người ta đã phát hiện được một họ mới của các protein kháng apoptosis đó là các chất ức chế apoptosis (inhibitors of apoptosis –IAP) - các protein IAP của người cảm ứng XIAP, HIAP1, HIAP2, NAIP, BRUCE và Survivin. Protein ức chế apoptosis của neuron (neuron apoptosis inhibitor protein –NAIP) được biểu hiện trong các tế bào thần kinh. Việc điều khiển NAIP bởi các vec tơ adenovirus đã làm giảm sự chết của các neuron hải mã trong trường hợp thiếu máu cục bộ và cứu được các neuron vận động trong mô hình axotomy thực nghiệm.

18.5 Cấy ghép neuron và các tế bào gốc

18.5.1 Từ cấy ghép thực nghiệm tới các ứng dụng trong lâm sàng

Trong những năm 1980 và 1990 đã có những ý tưởng cấy ghép neuron, thiết lập các thông số về việc kéo dài tối đa sự tồn tại và chức năng của các tế bào ghép. Một trong số những nhà khoa học đi tiên phong trong lĩnh vực này là Anders Björklund thuộc Trường Đại học Lund, Thụy Điển. Các nhà khoa học ở đây đã chế tạo thành công các công cụ để hoàn thiện công việc cấy ghép tế bào trong HTKTƯ. Trong gần 20 năm việc cấy ghép tế bào vào não bộ với các đối tượng Parkinson đã được gọi lên từ phòng thí nghiệm tới các thử nghiệm lâm sàng. Bảng (18.3) liệt kê một số thay đổi cần thiết để kéo dài tối đa sự tồn tại của các tế bào khi được ghép vào thần kinh trung ương.

Bảng 18.3 Những biến đổi nhằm kích lệ sự tồn tại của các tế bào được ghép trong não bộ.

Các tế bào phôi thai : tồn tại tốt hơn các tế bào đã trưởng thành
Vật chủ trẻ: tiếp nhận ghép dễ hơn
Các yếu tố dinh dưỡng: cải thiện sự tồn tại và tăng cường các quá trình tăng trưởng
Cửa đích: là then chốt cho sự tồn tại dài hạn
Cung ứng mạch: cần thiết để tồn tại
Hòa hợp miễn dịch: giảm các rủi ro của sự thải loại

Vào những năm 1980 và 1990, các mô đã được cấy ghép vào não bộ để nghiên cứu các khía cạnh về sự phát triển tế bào neuron và xác định chức năng của các vùng khác nhau trên não. Các mô hình trên động vật về sự thoái hóa thần kinh trung ương cũng đã được nâng cấp rất nhiều. Sự duy trì và hiệu ứng khôi phục của các neuron và các tế bào thần kinh đệm khác trên các động vật đã được nghiên cứu từ các khía cạnh tế bào, phân tử cho tới hành vi. Hiện nay chúng ta đang trong kỷ nguyên mới của việc thiết lập các kỹ thuật cấy ghép các tế bào thích hợp nhất để áp dụng vào lâm sàng. Đáng tiếc là những biến đổi về sự hồi phục chức năng thấy ở một số mô hình động vật về các bệnh thần kinh lại không thấy khi áp dụng trên người. Trường hợp cấy ghép điểm các neuron chất xám thì người ta tiêm lập thể neuron vào thể vân của các bệnh nhân Parkinson. Trong khi đó ở chuột tổn thương 6-OHDA (mô hình Parkinson trên chuột) khi được ghép chất xám thì phục hồi rất đáng kể về sự suy yếu hành vi. Hiệu quả tiếp nhận các neuron phôi thai khi tiêm lập thể (tiêm vào một vị trí xác định trong không gian) của các bệnh nhân Parkinson cũng không giống như các kết quả trong phòng thí nghiệm. Những kết quả thu được từ các thử nghiệm lâm sàng khởi đầu đã được khích lệ phần nào vì không thấy xuất hiện các hiệu ứng phụ đáng kể. Một tế bào được cấy ghép vào thể vân người duy trì được hàng năm và một số bệnh nhân giảm đáng kể các hội chứng vận động (co cứng và vận động chậm chạp). Trên thực tế, đã có những báo cáo cho thấy sự tồn tại của các neuron phôi thai ghép có thể kéo dài tới 8 năm. Cũng có những cải thiện nhỏ ở một số bệnh nhân mặc dầu hiệu ứng này dần dần sẽ mất đi. Tuy nhiên cũng có những thay đổi đáng kể ở bệnh nhân này hay bệnh nhân khác. Cho tới nay, chúng ta vẫn chưa dự đoán được bệnh nhân Parkinson nào sẽ là ứng cử viên lý tưởng cho việc cấy ghép.

Một trong số các vấn đề cơ bản của cấy ghép các neuron vào động vật ở phòng thí nghiệm cũng như vào não người vẫn còn tồn tại là sự sống sót ít ỏi của các neuron. Ở người chỉ có khoảng 5% neuron dopamine phôi thai là còn sống sót với các quy trình cấy ghép đương thời.

Tuy nhiên, trên động vật thì chỉ cần có sự sống sót ít ỏi của các tế bào ghép cũng đã làm phục hồi đáng kể về hành vi. Điều nổi bật là đại diện cho mô hình động vật với bệnh Parkinson của người phải như thế nào?. Mặc dầu các neuron phôi thai đã thể hiện tiềm năng lớn nhất về hiệu ứng lâm sàng cũng như sự sống sót của mảnh ghép đối với bệnh Parkinson. Nhưng vẫn còn rất nhiều vấn đề nghiêm túc đặt ra đối với việc sử dụng các neuron phôi thai người như khả năng của các mô, việc kiểm soát chất lượng mô và cả các vấn đề thuộc luân lý học nữa. Để khắc phục một số khía cạnh của các vấn đề này, cần phải nghiên cứu đánh giá việc cấy ghép khác loài neuron đối với bệnh Parkinson cũng như ứng dụng các tế bào neuron và các tế bào gốc được nuôi cấy. Ngày nay người ta có khả năng phân lập được các tiểu quần thể của các tế bào neuron và các tế bào gốc bằng cách cho phát triển rồi nhân lên các tế bào bằng nuôi cấy sau đó dùng các tế bào này để cấy ghép hoặc được dùng như các phương tiện vận chuyển gen tới các vị trí lựa chọn trên hệ thần kinh. Những tế bào này tồn tại *in vivo* trong môi trường giàu các yếu tố tăng trưởng và biểu hiện được kiểu hình neuron. Lợi thế chính của việc sử dụng các tế bào tổ tiên cho

việc cấy ghép là chúng không bị biến nạp hoặc bất tử hóa và tồn tại một cách tự nhiên trên não. Sự cộng tác giữa các nghiên cứu lâm sàng và cơ bản khi sử dụng các tế bào tiền thân hoặc các tế bào gốc cho việc chuyển gen *in vivo* là rất cần thiết để phát triển GTL trong Parkinson và các bệnh thoái hóa thần kinh khác.

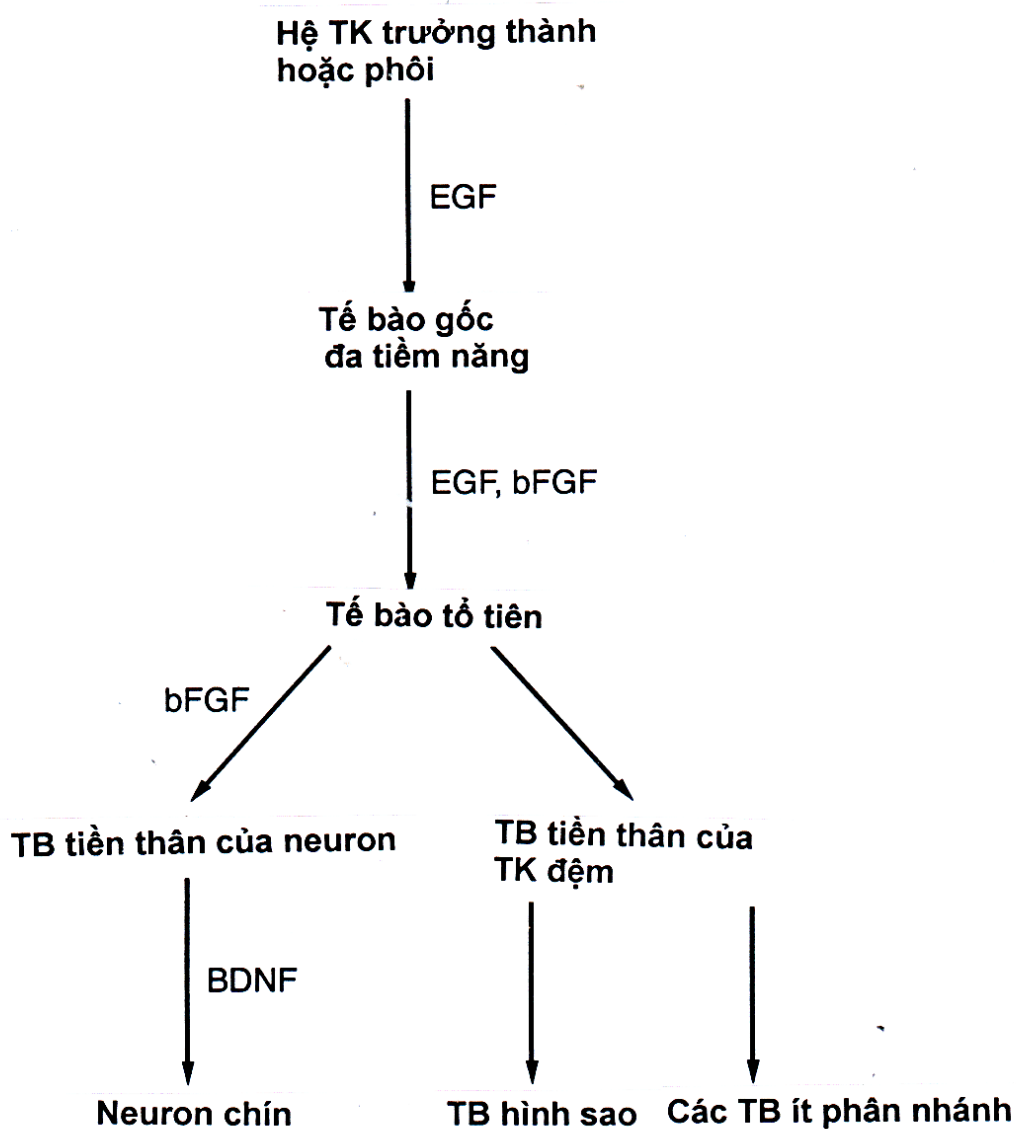
Như đã đề cập ở trên, nhiều dòng tế bào sơ cấp không phải neuron đã được sử dụng rộng rãi như là một phương tiện để chuyển các chất hoạt hóa nhằm thúc đẩy sự sống sót hoặc làm tăng trưởng các neuron. Các tế bào nguồn gốc không phải neuron (nguyên bào sợi, nguyên bào cơ) thì không hợp nhất được vào mô não của vật chủ, vì thế nó tồn tại như một khối mô cô lập. Những dạng tế bào này là ngoại lai đối với não và chúng ta không thể biết trước được những hậu quả lâu dài của những tế bào ngoại lai này trong hệ thần kinh trung ương. Vì vậy tế bào lý tưởng dùng để thay thế nên lấy từ hệ thần kinh trung ương. Các nghiên cứu hiện nay đều tập trung vào các chiến lược thay thế tế bào mà nổi bật là việc sử dụng các tế bào gốc thần kinh. Các tế bào này có thể đã được biệt hóa hoàn toàn và hợp nhất vào hệ thần kinh trung ương. Điều này đã tạo nên viễn cảnh tuyệt vời cho việc trị liệu cũng như chuyển giao các sản phẩm của gen.

18.5.2 Các tế bào gốc ở não người trưởng thành

Cho tới tận vài năm trước đây người ta vẫn giả thiết rằng não bộ người không có khả năng sản sinh ra các neuron mới. Nghiên cứu trên nhiều khía cạnh, người ta đã xác định được rằng não động vật có vú trưởng thành có chứa các tế bào gốc có thể mở rộng khả năng hoạt động của các tế bào neuron và thần kinh đệm. Đặc biệt ở vùng dưới não thất (subventricular zone) có một lớp mỏng rất quan trọng được hình thành trong thời kỳ tăng trưởng và còn tồn tại cho tới khi trưởng thành. Lớp mỏng này có khả năng sản sinh ra các neuron và thần kinh đệm (Hình 18.7). Các tế bào gốc được xác định một cách chính xác trên động vật là có khả năng tăng sinh, tự đổi mới, sản sinh con cháu với đặc trưng đa dòng và có khả năng phân chia khi bị tổn thương. Các tế bào tổ tiên là các tế bào có ít tiềm năng hơn các tế bào gốc, các tế bào tiền thân là các tế bào có trong một tiến trình phát triển nào đó. Sự hiện diện của các tế bào gốc thần kinh ở não người trưởng thành đã gợi lên khả năng sử dụng não trưởng thành như là một nguồn cung cấp các tế bào tiền thân để cấy ghép và giúp cho việc thiết lập các hướng trị liệu mới đối với các tổn thương và bệnh thần kinh. Trên thực tế, chúng ta đã hiểu sự phát triển sinh học thần kinh tế bào gốc, có thể kiểm soát được sự tăng sinh và sự dịch chuyển của những tế bào này trong các vùng của hệ thần kinh bị tác động bởi bệnh. Khái niệm về sự tự sửa chữa ở não bộ hiện nay có thể hiện rõ từ các nghiên cứu cơ bản. Với các kỹ thuật giải phẫu thần kinh hiện đại và hiệu quả Sanjay Magavi, Blair Lett và Jeffreg Macklis thuộc Bệnh viện nhi, Đại học Y khoa Harvard – Hoa Kỳ đã chỉ rõ rằng các tế bào gốc trong não chuột trưởng thành có thể dịch chuyển và thay thế cho những neuron đã trải qua apoptosis ở phần vỏ mới (neocortex). Hơn nữa, những neuron mới được sản sinh này cũng tạo được sự kết nối tới các đích thích hợp của chúng.

Sự tăng sinh và biệt hóa của các tế bào gốc đa tiềm năng có thể được điều hòa bởi các yếu tố DDTK. Chẳng hạn như yếu tố tăng trưởng bì (epidermic growth factor- EGF) có thể cảm ứng sự tăng sinh của các tế bào gốc (từ phôi) của mô thần kinh trung ương người trưởng thành *in vitro*. Khi thêm các yếu tố tăng trưởng vào các tế bào thần kinh thì chúng sẽ điều hòa tế bào để có các đặc tính của neuron hoặc thần kinh đệm. Khi thêm yếu

tổ tăng trưởng nguyên bào sợi vào các tế bào tổ tiên (từ EGF) thì các tế bào gốc sẽ đáp ứng sản xuất ra các tế bào tổ tiên neuron.



Hình 18.7 Mô hình lý thuyết về sự phát sinh các tế bào neuron và thần kinh đệm từ các tế bào gốc trong não bộ. Các yếu tố tăng trưởng tiềm ẩn điều hành sự giao phó và biệt hóa của các dòng neuron.

(Theo Laurie C. Doering. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Các nghiên cứu GTL đang hướng vào chiến lược tế bào gốc thần kinh. Người ta hy vọng rằng các tế bào tổ tiên hoặc các tế bào gốc sẽ giữ vai trò đặc biệt quan trọng về hiệu quả

của GTL ở HTKTƯ. Với khả năng biệt hóa đa dòng tế bào, các tế bào gốc có thể sẽ rất hiệu quả đối với sự chuyển giao các sản phẩm gen trị liệu qua não hay tủy sống. Tiềm năng của sự tổ hợp các tế bào tổ tiên với GTL HTKTƯC đã được chứng minh bởi Evan Snyder, Rosanne Taylor và John Wolfe năm 1995. Các nhà khoa học chứng minh rằng các tế bào gốc thần kinh được công nghệ hóa tiết ra enzyme β -glucuronidase (GUS) có thể chuyển giao mức GUS trị liệu đủ để kéo dài thời gian sống sót của chuột trong mô hình bệnh do tích tụ ở lysosome (LSD) di truyền thần kinh - mucopolysaccharidose type VII (MPSVII). Sự thiếu hụt enzyme này trong mô hình chuột gây nên sự tích tụ lysosome do giảm lượng glucosaminoglycan trong não và các mô khác do sự biến đổi thoái hóa ngay từ phôi thai. Khi tải nạp nguyên bào sợi bằng một retrovirus mã cho GUS đã “dọn sạch” các tổn thương lysosome trong mô hình này. Khả năng làm mất sự căng phồng lysosome của neuron và các tế bào thần kinh đệm bằng GTL là một bước tiến quan trọng vì hầu hết các bệnh nhân đều chưa được chẩn đoán là LSD cho tới khi các tổn thương đã tiến triển đầy đủ, tác động tới kiểu hình. Cách trị liệu tương tự cũng được áp dụng cho các bệnh thần kinh di truyền khác mà đặc trưng là không có các sản phẩm gen tiết. Các tế bào công nghệ hóa và các tế bào tổ tiên cũng được ghép vào não chuột trong mô hình thiếu hụt hexosaminidase gây bệnh Tay - Sachs và Sandhof.

18.5.3 Chuyển gen ung thư tới các tế bào thần kinh

Có nhiều phương pháp đã được phát triển để tạo ra các dòng tế bào từ các tế bào sơ cấp và các nhà sinh học thần kinh phát triển đã sử dụng các vec tơ retrovirus có cấu trúc đặc biệt để thiết lập các dòng tế bào từ HTKTƯ đang phát triển. Các dòng tế bào gốc hoặc các tế bào tổ tiên đã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu các khía cạnh của sự biệt hóa các dòng neuron và thần kinh đệm. Các dạng này của các dòng tế bào tổ tiên được dùng để nhận dạng các phân tử và các yếu tố DDTK làm nhiệm vụ khởi đầu và thúc đẩy sự biệt hóa ở các thời điểm phát triển đặc biệt. Các dòng đặc hiệu về giai đoạn phát triển của các neuron hoặc các tế bào thần kinh đệm đã được thiết lập với các vec tơ retrovirus có chứa các gen ung thư như kháng nguyên T tạo khối u lớn của virus khỉ SV40 (simian virus 40 karge tumor T antigen)-*neu* và họ *myc*.

Họ *myc* của các tiền gen ung thư bao gồm nhiều thành viên đã rõ các đặc tính như *c-myc*, *N-myc*, và *L-myc*. Gen *myc* nguyên bản được xác định là một gen ung thư của virus gây bệnh bạch cầu của chim MC29. Retrovirus này cảm ứng nhiều bệnh ung thư, ngoài bệnh bạch cầu tủy bào (myelocytomatosis -*myc*) ở chim nó còn có thể biến nạp các tế bào sơ cấp trong nuôi cấy mô. Việc biến nạp các tế bào từ hệ thần kinh đang phát triển với một retrovirus biểu hiện *v-myc* sẽ làm thể hiện rõ các nét đặc trưng đặc biệt của chúng. Trong nuôi cấy, các tế bào tổ tiên được bắt tử hóa với gen ung thư *v-myc* thì phân chia liên tục. Tuy nhiên, khi rời khỏi môi trường nuôi cấy và được ghép lại vào hệ thần kinh trên động vật tại phòng thí nghiệm thì những tế bào bắt tử *v-myc* này đã vượt ra khỏi chu kỳ tế bào để đi tới sự biệt hóa tốt cùng. Ngoài ra, một số tế bào tổ tiên thần kinh được sản sinh có *v-myc* chẳng những dừng phân chia trên não động vật mà còn trải qua sự biệt hóa đặc hiệu vị trí. Một dòng tế bào đã biết rõ các đặc tính (C17.2) với các đặc trưng của tế bào gốc sẽ có được các đặc trưng thần kinh đệm hoặc neuron khi nó được đặt ở vùng chất trắng hay chất xám. Các tế bào C17.2 cũng biệt hóa thành kiểu hình neuron và biểu hiện đặc hiệu chất dẫn truyền thần kinh của các vùng cấy ghép. Hàng trăm lần ghép các tế bào neuron có mang gen *v-myc* đã được nghiên cứu trên động vật ở phòng thí nghiệm tại

nhiều vùng của hệ thần kinh trung ương và ngoại biên và không có trường hợp ghép đơn nào có sự tăng sinh liên tục (phát triển khối u). Do vậy, các tế bào có gen ung thư được xếp vào thứ hạng đặc biệt có các đặc trưng mong muốn cho các chiến lược thay thế tế bào để phục hồi các chức năng của hệ thần kinh. Tuy nhiên cho tới thời điểm này, các cơ chế chính xác về sự biểu hiện các sản phẩm gen ung thư v-myc và việc kéo các tế bào ra khỏi chu kỳ phân chia thì vẫn chưa rõ.

18.6 Các bệnh thoái hóa thần kinh trên lâm sàng

18.6.1 Bệnh Alzheimer

Theo nghĩa chính xác nhất thì Alzheimer cũng như Parkinson là các chứng rối loạn hơn là một loại bệnh bởi vì các tác nhân bệnh lý học hiện nay đã được xác định. Alzheimer là đại diện lớn nhất của sự suy thoái tâm thần ở những người già, nó tác động tới khoảng 4 triệu người ở Hoa Kỳ và khoảng 300.000 người ở Canada. Tỷ lệ mắc bệnh ở nam và nữ đều như nhau. Nhà sinh lý học Đức Alois Alzheimer đã mô tả bệnh này đầu tiên vào năm 1907 - đó là trường hợp một phụ nữ 51 tuổi với các triệu chứng buồn chán, ảo giác, sa sút trí tuệ, và các xét nghiệm sau khi chết thấy rất ít các tế bào trong phần vỏ não, đồng thời lại có búi sợi giữa các tế bào thần kinh.

Alzheimer là một bệnh thoái hóa não tiến triển, thường liên quan chặt chẽ với tuổi tác. Mặc dầu nhiều người tới tuổi 60 bệnh mới phát triển bệnh, nhưng cũng có những người phát bệnh từ lúc còn trẻ. Dù bệnh phát triển ở bất cứ thời điểm nào thì Alzheimer luôn luôn là một bệnh thoái hóa tiến triển. Những người trước kia rất vững vàng thì dần dần trở nên phụ thuộc vào người khác trong tất cả các hoạt động thường ngày.

Nhận dạng trước tiên của Alzheimer là sự thay đổi một cách tinh tế về hành vi. Khó nhớ trong chốc lát rồi trở nên thường xuyên. Việc điều chỉnh tới các vị trí khác rất căng thẳng. Việc học tập, các quyết định về các nhiệm vụ cần phải thực hiện trở thành những vấn đề lớn. Dần dần sự kiểm soát cảm xúc ngày càng trở nên khó khăn.

Mặc dầu đã có nhiều hy vọng, nhưng nguyên nhân thật sự của Alzheimer thì vẫn chưa được xác định. Các nhà khoa học nhận ra rằng có 2 thể loại Alzheimer: thể loại gia đình và thể loại rải rác. Thể loại gia đình (thường đề cập như là Alzheimer bùng phát sớm) hoàn toàn do di truyền. Những mẫu di truyền trội có liên quan tới các đột biến đặc biệt trong các gen mã cho presenilin 1 (PS1), presenilin 2 (PS2) và protein tiền thân hóa bột (amyloid precursor protein -APP). Những đột biến của tất cả 3 locus này sẽ dẫn tới tăng sản xuất polypeptide A β 42 hóa bột. Protein này từ APP và từ vùng vận chuyển màng của tế bào. Những sự cố bất thường về phosphoryl hóa sẽ dẫn tới phân giải A β 42 ở mạng thần kinh và ở thành mạch máu và đó có thể là yếu tố khởi đầu của Alzheimer. Người ta đã xác định được 10-20% trường hợp Alzheimer thuộc nhóm gia đình. Nhóm này tiến triển nhanh hơn thể rải rác - thể bùng phát muộn thường sau 65 tuổi. Thể bùng phát muộn có liên quan tới sự có mặt của alen APOE ϵ 4. APOE là một protein huyết thanh làm trung gian cho sự tích trữ, vận chuyển và chuyển hóa cholesterol. Sự xuất hiện của alen APOE không thể dự đoán được rủi ro của Alzheimer nhưng rõ ràng nó ảnh hưởng tới tuổi xảy ra sự cố.

Trong bệnh Alzheimer có sự thoái hóa mạng lưới thần kinh (neurophil) ở sợi trục và sợi nhánh của não bộ, đập tắt sự qua lại bình thường của các tín hiệu giữa các tế bào. Những vùng tâm điểm của thoái hóa (mảng lão suy) (senile plaque) có đặc trưng tế bào học đặc

biệt. Những mảng này bao gồm các neuron đang trong quá trình thoái hóa cùng với các chất cặn ngoại bào là các peptide bột hóa. Các locus này thuộc tế bào hình sao mới và các vi thần kinh đệm. Ngoài ra, sự thay đổi cũng xảy ra ở bên trong các neuron dẫn đến sự hủy hoại cơ xương và tích tụ các protein sợi bất bình thường trong các mảng xoắn lại gọi là mớ rối sợi thần kinh. Các mớ rối này chủ yếu là dạng phosphoryl hóa bất bình thường của tau - một protein gắn với các vi ống như một bộ phận của khung tế bào thần kinh.

Mức độ nghiêm trọng của sự thoái hóa thần kinh liên quan tới mật độ dày đặc của mảng dây thần kinh bị viêm và mớ rối thần kinh ở các vùng vỏ não. Acetylcholine và somatostatin là các chất DTKK chính bị rút hết ở các bệnh nhân Alzheimer.

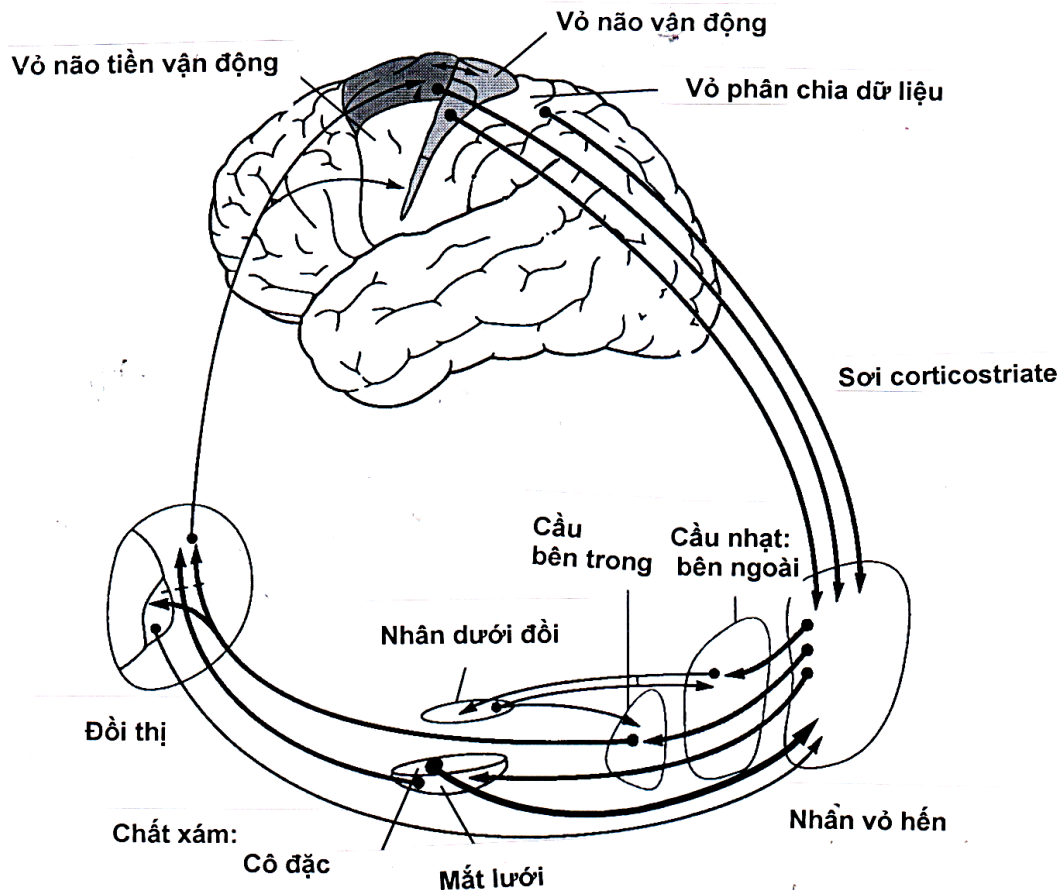
Chắc chắn có các bằng chứng liên quan tới các neuron tiết acetylcholine, chúng là trung gian của sự mất trí nhớ trong Alzheimer. Sự ốm yếu là do hủy hoại chọn lọc các neuron ở phần vỏ mới, ở vùng hải mã và hệ thống tiết acetylcholine ở não trước. Trên thực tế, sự lan rộng các khiếm khuyết về sự tiết acetylcholine có liên quan tới mức độ suy giảm trí nhớ và mất chức năng tiết acetylcholine. Đó là một trong những biến đổi sớm nhất thấy ở Alzheimer. Yếu tố tăng trưởng thần kinh ảnh hưởng tiềm tàng tới sự tồn tại của các neuron tiết acetylcholine và sự xử lý của NGF ngăn ngừa được sự hao mòn neuron ở người bình thường và các trường hợp tổn thương thực nghiệm. Những điều quan sát thấy trên đã định hướng cho GTL với NGF trong bệnh Alzheimer. Trong chương này chúng ta sẽ đề cập tới các thực nghiệm ứng dụng GTL Alzheimer, Parkinson trên các mô hình động vật cũng như các thử nghiệm trên lâm sàng.

18.6.2 Bệnh Parkinson

Năm 1817, một bác sĩ người Anh tên là James Parkinson đã xuất bản một công trình khoa học dưới tiêu đề “*phân tích hiện tượng run rẩy tay chân*”. Trong công trình này ông đã phác thảo những hội chứng chính một bệnh mà sau này mang tên ông – bệnh Parkinson. Người ta ước tính có khoảng một triệu người Mỹ mắc bệnh thoái hóa thần kinh này. Bệnh thường tác động vào nam giới cũng như nữ giới ở tuổi 40 hoặc già hơn. Các hội chứng thường xuất hiện chậm và không có thứ tự gì đặc hiệu. Trên thực tế, nhiều năm trước khi các hội chứng sớm xuất hiện mọi hoạt động của bệnh nhân vẫn bình thường. Có 4 dấu chuẩn của hội chứng là co cứng, yếu ốm, run chân tay, vận động chậm chạp hoặc bị liệt (vận động chậm hoặc không vận động được) và không ổn định tư thế do thăng bằng kém. Parkinson gây nên bởi sự hủy hoại tiến triển một vùng nhỏ ở não giữa gọi là chất xám. Vùng này có các neuron sản xuất ra các chất DTKK dopamine. Dopamine được vận chuyển qua sợi trục và kết thúc ở thể vân - một cấu trúc lớn bao gồm các nhân đuôi (caudate nucleus) và hạch. Cấu trúc này là một bộ phận của nhân cơ bản và có liên quan tới sự hoạt động phức tạp của cơ như chỉnh tư thế, vận động và giữ thăng bằng. Thể vân có thể được xem như là một đáp ứng ức chế các vận động không mong muốn và cho phép các hoạt động được chọn lọc. Khi các neuron chất xám bị chết thì một phần dopamine được chuyển tới thể vân. Các nhóm neuron khác gắn với thể vân cũng có thể bị chết. Dần dần, do ngưỡng dopamine thấp nên dẫn đến hội chứng thần kinh (Hình 18.8). Đó là các hiện tượng cơ bị co cứng và khó cúi, dáng đi thay đổi và thường bị trao đảo, khi đang đi mà dừng lại thì khó mà đi tiếp được, có thể xuất hiện sự chà sát ngón tay cái (do run mạnh). Những biến đổi cũng xuất hiện trên mặt đó là hiện tượng “giống mặt nạ”. Nói năng

trở nên chậm, rất chậm và đơn điệu. Mất hết các kỹ năng vận động chính xác và chữ viết có nét rất riêng biệt.

Parkinson bùng phát sớm di truyền được và có tính chất gia đình do một gen dễ bị ảnh hưởng định vị ở cánh tay dài (q) của nhiễm sắc thể số 4 băng 21 (4q21). Mihael Polymeropoulos và cộng sự ở viện nghiên cứu quốc gia hệ gen người tại Bethesda, Maryland đã chứng minh rằng có một đột biến ở gen α -synuclein (có sự thay thế alanine bằng threonine ở vị trí 53) mã cho protein thần kinh xi nấp trên (trước) đã được xác định là lỗi trong một gia đình người Italia năm 1997. Có nhiều gen khiếm khuyết phụ bao gồm *parkin*, *PARK3*, *UCH-L1* và *2p13* cũng đã được xác định ở một số thành viên trong gia đình này.



Hình 18.8 Các vòng của hạch cơ bản. Nhiều liên kết qua lại được tạo thành giữa các nối thần kinh chất xám với thể vân (hạch). Dopamine được tạo ra ở chất xám sẽ được chuyển tới hạch (mũi tên). Sự chết của neuron chất xám sẽ làm giảm mức dopamine vận chuyển tới hạch và gây nên hội chứng thần kinh của Parkinson.

(Theo Laurie C. Doering. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Việc điều trị hiện tại đối với Parkinson là nhằm kiểm soát các hội chứng. Trị liệu được lý sơ cấp dựa trên cơ sở làm tăng mức dopamine ở não bằng cách cung ứng chất tiền thân L-DOPA và làm vô hiệu hóa các hiệu ứng phụ bằng cách cho đồng hấp phụ chất ức chế DOPA – decarboxydase ngoại biên. Kết hợp các thuốc L-DOPA/carbidopa là phương pháp sơ cấp làm giảm chứng liệt và co cứng sớm ở giai đoạn giữa của Parkinson. Các nghiên cứu cơ bản và GTL đã bắt đầu hướng tới việc phòng ngừa sự mất mát các neuron tổng hợp dopamine (có thể bằng cách cung cấp các yếu tố DDTK) hoặc bằng các tế bào công nghệ hóa để nâng cao nồng độ dopamine ở thể vân).

Các kỹ thuật hiện đại nhằm cải thiện chức năng của hạch cơ bản và các tổ chức là phẫu thuật cho các bệnh nhân Parkinson. Cộng hưởng từ và theo dõi điện sinh lý trong khi phẫu thuật sẽ cho phép định vị một cách chi tiết các bộ phận trong não. Quy trình thông thường là thủ thuật mở cầu nhát (pallidotomy) và kích thích sâu phần đồi thị của não. Với sự kích thích tần số cao thông qua các điện cực đặt sâu trong não sẽ tạo các thương tổn chức năng tại vùng đích (kích thích não sâu). Một trong số các ứng dụng chính của phẫu thuật thần kinh là kiểm soát L-DOPA cảm ứng loạn vận động bằng cách cắt bỏ dòng điện ở cầu cơ cùng cụt trước sau (thủ thuật cầu nhát) (the posterior ventral globus pallidus – pallidotomy).

18.6.3 Bệnh Huntington

Năm 1872, George Huntington đã mô tả một bệnh mà cha và ông của mình đã quan sát được ở một số thế hệ bệnh nhân của họ. Bệnh Huntington (HD) là một bệnh thoái hóa thần kinh di truyền với sự hủy hoại tích lũy hạch cơ bản. HD biểu hiện trội và tác động với tỷ lệ 5/100.000 người. Người ta đã tính được rằng có 30.000 bệnh nhân HD tại Hoa Kỳ, trong đó 15.000 người (50%) là rủi ro di truyền từ bố mẹ. Bệnh phát triển một cách tinh tế trong thập kỷ thứ 4 và thứ 5 của đời người và sấu dần đi trong 10-20 năm sau cho tới khi chết. Hình ảnh chuẩn mực được xác định là múa giật (di chuyển giống như nhảy). Hội chứng vận động phát triển dần dần, khởi đầu là không tự chủ được sự vận động và tình trạng này cứ tăng lên cho tới khi bệnh nhân phải nằm trên giường hoặc trên xe đẩy. Mất nhận diện và rối loạn tâm thần thể hiện trên nét mặt. Hội chứng về vận động thể hiện là sự đi lại vụng về, cứng nhắc và trắc trở. Về khía cạnh sa sút tâm thần gồm suy sụp trí nhớ, không tập trung tư tưởng. Nếu hội chứng tâm thần xuất hiện thì sẽ có các tình tiết buồn chán, mất ổn định và thậm chí có trạng thái đờ đẫn. Về mức độ bệnh lý thần kinh thì thấy sự mất mát chọn lọc các neuron, đặc biệt là trong thể vân (vùng đuôi và hạch). Tổ hợp đặc biệt của các neuron tiết acetylcholine, GABA và chất P bị chết và đi tới các đầu hướng tâm dopamine trong thể vân tương đối nguyên vẹn. Sự chết của các tế bào thần kinh trong thể vân (90%) sẽ gây nên chứng múa giật. Các vùng tăng sinh của thần kinh đệm tế bào hình sao thể hiện rõ ràng. Sự teo đáng kể của thể vân và sự phì đại não thất (ventricles) có thể quan sát thấy qua phương pháp chụp cắt lớp và cộng hưởng từ hạt nhân. Hiện nay chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu đối với bệnh này.

Mặc dầu sự khiếm khuyết gen gây nên bệnh Huntington đã được gán cho NST số 4 từ năm 1983, nhưng phải mất thêm 10 năm nữa các nhà khoa học mới xác định đích xác gen này. Các sản phẩm của gen này là protein có tên *huntingtin*. Nhóm các nhà nghiên cứu bệnh Huntington đã chỉ rõ rằng phần gen này có chứa nucleotide CAG lặp đi lặp lại nhiều lần, gây nên sự kéo dài mạch polyglutamine trong protein huntington đột biến. Có mối liên hệ giữa sự tăng các lặp CAG trong gen và tuổi bùng phát các hội chứng lâm sàng. Nếu số

lặp CAG trên 50 thì chắc chắn liên quan với thể Huntington thiếu thời, còn với những người có số lặp là 40 thì sẽ bùng phát dần thành bệnh Huntington. Chưa thấy ai có số lặp ít hơn 30 mà phát triển Huntington. Tuy nhiên, chức năng của trình tự nucleotide này vẫn chưa được xác định. Mặc dầu các tế bào thần kinh bị chết là có chọn lọc, nhưng các bản phiên mã gen đột biến lại biểu hiện nhiều trong não bộ và các mô của hệ thần kinh. Gen này có liên quan tới các yếu tố phiên mã để điều hòa sự biểu hiện của các gen khác. Bởi vì HD là trội nên hầu hết các bệnh nhân HD đều có thể mang một bản phiên mã của gen cặp ba mở rộng và một bản phiên mã bình thường của gen. Vì thế ở thế hệ sau mỗi đứa con của họ đều có 50/50 cơ hội nhận được gen và 50/50 có hội được di truyền.

18.6.4 Bệnh xơ cứng cột bên teo cơ

Xơ cứng cột bên teo cơ (amyotrophic lateral sclerosis – ALS) cũng được gọi là các bệnh thần kinh vận động. Tỷ lệ mắc bệnh này ở Hoa Kỳ là 1-3/100.000 người. Triệu chứng chính là thoái hóa hệ thống neuron vận động trên và dưới (upper and lower motor neuron) ở não và tủy sống. Các neuron vận động dưới cấu thành nên các neuron lớn ở vùng sừng trước của tủy sống gắn với cơ xương tự chủ (voluntary) của thân. Các neuron vận động trên là các neuron hình chóp nằm ở vỏ não, nó tương tác và thúc đẩy các hoạt động của các neuron vận động dưới. Các neuron thường biểu hiện tác động với sự tích tụ các sợi thần kinh đã phosphoryl hóa trong vùng gần giữa sợi trục bị sưng lên và trong các tế bào. Có các dấu hiệu thoái hóa của sợi trục dẫn đến làm giảm số lượng neuron vận động ở tủy sống và các nhân gốc não (brain stem nuclei). Khi mất số neuron hình chóp ở phần vận động của não thì sẽ gây thoái hóa hệ thống tủy sống vỏ não đáp ứng cho sự vận động tự chủ. Bệnh rất tiến triển và cuối cùng là cơ bị teo đi và yếu do các neuron đang bị thoái hóa. ALS thể rải rác chiếm 90% các trường hợp, chỉ có 10% bệnh nhân là có liên quan tới tiền sử gia đình. Người ta thấy rằng trong số những đột biến gen superoxyde dismutase đồng-kẽm (copper-zinc superoxyde dismutase - SOD1 gene) ở NST số 21 có liên quan tới ALS thì chỉ có 20% là có liên quan tới yếu tố gia đình. SOD1 là một nhóm các enzyme xúc tác cho sự chuyển đổi $\cdot O_2$ thành hydrogen peroxyde và oxygen. Các enzyme này làm cho tế bào kháng lại được các gốc $\cdot O_2$ và các dẫn suất độc. Nguyên nhân gây ra ALS vẫn chưa rõ và chưa có cách chữa trị bệnh này. Thường là từ khi được chẩn đoán chắc chắn là ALS thì bệnh nhân chỉ sống thêm được 2-5 năm, nhưng cũng có trường hợp sống được lâu hơn. ALS được nhận dạng và phân loại trên cơ sở lâm sàng vì hiện nay chưa có test chẩn đoán đặc hiệu với bệnh này.

Bệnh thể hiện theo nhiều cách, phụ thuộc vào cơ bị tác động đầu tiên. Triệu chứng chung bao gồm vấp ngã, mất khéo léo chân tay, mất trương lực cơ tay và nuốt khó khăn. Khi bệnh đã tiến triển thì thường xuyên bị co rúm cơ. Sự thoái hóa của các thành phần cơ thần kinh có thể hiện diện một thời gian trước khi có các triệu chứng liên quan thực sự. Trong nhiều trường hợp, tất cả các cơ tự chủ đều bị tác động và bệnh nhân bị liệt hoàn toàn.

18.6.5 Bệnh đa xơ cứng

Đa xơ cứng (multiple sclerosis-MS) là một bệnh mạn tính của HTKTƯ có liên quan tới sự suy giảm chức năng thần kinh. Có khoảng 35.000 bệnh nhân tại Hoa Kỳ và phụ nữ bị tác động gấp đôi nam giới. MS thường bắt đầu vào khoảng giữa của lứa tuổi từ 15 đến 50 và

trung bình là 30 tuổi. Nguy cơ của MS thay đổi ở các vùng địa lý khác nhau và có xu hướng tăng khi người cha sống ở Bắc hay Nam xích đạo. Có một số dạng MS, nhưng hầu hết các bệnh nhân (85%) đều là bệnh không bị tái phạm, với sự bùng phát đột ngột các vấn đề thần kinh nhưng rồi sau đó cũng được xua tan.

Tất cả các dạng MS đều liên quan tới viêm HTKTƯ cùng với việc xuất hiện các vùng bị mất myelin. Nhiều tổn thương rải rác ngẫu nhiên (các mảng), các vị trí đại diện cho sự hủy hoại myelin tích tụ trong não và tủy sống và gây nên nhiều vấn đề sinh học thần kinh. Khi myelin bị hủy hoại thì các dẫn truyền thần kinh bị chậm hoặc bị khóa hoàn toàn, dẫn đến sự suy giảm hoặc mất hẳn chức năng thần kinh. Các hội chứng thần kinh có thể tấn công nhiều ngày, nhiều tuần hoặc nhiều tháng. Hội chứng khởi đầu là mất bị mờ hoặc thấy hai hình, một số người có thể bị mù. Hầu như tất cả các bệnh nhân MS đều bị tê và yếu cơ ở các ngón tay, khó ngồi và khó giữ thăng bằng. Các hội chứng này có thể nghiêm trọng đến mức làm cho việc đi đứng bị kém đi, nói năng khó, mệt mỏi và choáng váng thường xuyên. Các hội chứng này có thể nhẹ hoặc nặng và có thể ở dạng tổ hợp khác nhau tùy thuộc vào vùng bị tác động trên HTKTƯ.

Mặc dầu các yếu tố môi trường và di truyền đã góp phần vào việc phát triển MS, nhưng nguyên nhân đích thực của MS thì vẫn chưa rõ. Mặc dầu MS là một bệnh không di truyền nhưng nó cũng có quan hệ gần gũi với các bệnh di truyền. Có những bằng chứng khẳng định chắc chắn rằng MS có liên quan tới hệ miễn dịch và chính hệ miễn dịch của bệnh nhân đã tấn công vào HTKTƯ. Trong MS, đích chính của hệ miễn dịch đã bị mất định hướng là myelin và các tế bào ít phân nhánh. Các tế bào hình sao tham gia cùng mô sẹo tạo thành các mảng ở não bộ và tủy sống. Các trung gian cho sự tấn công tự miễn là các tế bào T của bệnh nhân - một dạng bạch cầu có nguồn gốc từ tuyến ức, đáp ứng một cách bình thường với sự thâm nhiễm và tạo tính miễn dịch dài hạn. Đáp ứng tự miễn bất thường liên quan tới sự hoạt hóa các tế bào T giúp đỡ và T gây độc tế bào và làm giảm hoạt tính tế bào T kiểm chế. Gây viêm não tự miễn thực nghiệm (experimental autoimmune encephalitis –EAE) – một bệnh miễn dịch viêm HTKTƯ sẽ là một mô hình nghiên cứu MS. EAE được tạo ra trên động vật bằng cách gây miễn dịch với các protein myelin. Các nghiên cứu trên động vật hiện nay đã dẫn dắt các trị liệu gen thực nghiệm nhằm làm trì hoãn, kiểm soát hoặc ngăn ngừa MS để ứng dụng cho MS trong tương lai. Sự chuyển giao cục bộ các interleukin (IL-4, IL-10) bằng tải nạp với retrovirus hay biến nạp các lympho T đã trì hoãn được sự phát triển hoặc giảm bớt tính nghiêm trọng của EAE ở chuột đã được gây miễn dịch với protein cơ sở myelin.

18.7 Các thử nghiệm lâm sàng test các tế bào biến đổi gen và các yếu tố dinh dưỡng thần kinh đối với thoái hóa thần kinh

Việc trị liệu thoái hóa thần kinh trên người liên quan tới các quy trình chuyển gen phải được thực hiện ở giai đoạn phát triển sớm. Một số thực nghiệm lâm sàng đã được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả của các yếu tố DDTK đối với các bệnh của thần kinh trung ương cũng như ngoại biên. Bảng 18.4 liệt kê những bệnh thần kinh chủ yếu của hệ thần kinh trung ương và ngoại biên đã sử dụng các yếu tố DDTK trong các thử nghiệm tiền lâm sàng ở các pha I,II,III khác nhau.

Bảng 18.4 Các ví dụ về trị liệu lâm sàng với các yếu tố dinh dưỡng thần kinh

Bệnh	Các yếu tố dinh dưỡng thần kinh
Alzheimer	NGF
ALS	BDNF
Parkinson	GDNF
Xơ cứng cột bên teo cơ (ALS)	CNTF
Bệnh thần kinh đái tháo đường	NGF

Người ta đã chỉ rõ rằng, mặc dầu NGF đã được xác định và phân lập được từ hơn 40 năm trước, nhưng khái niệm sử dụng các yếu tố DDTK cho các ứng dụng lâm sàng chỉ mới dậy lên từ 10 năm nay. Những bước tiến lớn trong sinh học phân tử và tế bào cùng với sự nỗ lực cộng tác của các công ty công nghệ sinh học như Amgen, Genentech và Regeneron đã tạo được niềm tin về tính hiện thực của việc sử dụng các yếu tố DDTK cho các thử nghiệm lâm sàng.

Tại thời điểm này, các yếu tố DDTK đã được chuyển giao cho các bệnh nhân mà bệnh đã tiến triển đáng kể. Không giống như các mô hình bệnh trong phòng thí nghiệm, trong nhiều trường hợp chúng ta không thể dự đoán được sự bùng phát của loại bệnh đặc biệt này. Điều tốt nhất mà chúng ta có thể làm được ở thời điểm này là hy vọng có một yếu tố đặc biệt hoặc tổ hợp các yếu tố để có thể dừng hoặc làm chậm lại các hội chứng lâm sàng của các bệnh thần kinh này.

Năm 1991, lần đầu tiên Lars Olson và cộng sự thuộc viện Karolinska, Stockholm, Thụy Điển đã điều trị bệnh Alzheimer bằng cách truyền NGF qua thất não trong 3 tháng. Đáng tiếc là không thấy có sự cải thiện đáng kể nào trong việc nhận biết và ghi nhớ được thể hiện trong công trình nghiên cứu đầu tiên ngắn ngủi này, Tuy nhiên cũng thấy có sự cải thiện tức thời khi điều trị với NGF, nhưng sự cải thiện này cũng không thật sự rõ ràng. Dĩ nhiên với những bệnh nhân Alzheimer đã đến giai đoạn tiến triển cộng thêm nhiều vấn đề lâm sàng khác nữa (không liên quan với GNF) thì sẽ trở nên rất phức tạp cho việc xử lý. Khi sử dụng NGF cũng có các tác dụng phụ như chán ăn, mệt mỏi v.v..

Trên cơ sở các dẫn liệu rất hứa hẹn trên động vật, các thử nghiệm lâm sàng đã được thực hiện nhằm đánh giá hiệu lực của BDNF và CNTF đối với ALS. Các thử nghiệm về độ an toàn và hiệu quả của CNTF đầu tiên trên người không đạt yêu cầu vì có hiệu ứng phụ gây sút cân. Còn với các thử nghiệm pha III với BDNF đều thất bại do không có hiệu ứng lâm sàng. Mặc dầu các thử nghiệm đã khẳng định BDNF là an toàn và được dung nạp, nhưng cũng không thấy có sự khác biệt đáng kể lâm sàng trong hô hấp và sự sống sót giữa các bệnh nhân được điều trị và nhóm đối chứng. Tổ hợp CNTF và BDNF liều thấp cũng được đánh giá ở nhiều thử nghiệm với tư cách là phương pháp trị liệu tiềm năng đối với ALS.

Các thử nghiệm pha I liên quan tới cấy ghép vào bệnh nhân ALS các nang polymer có chứa các tế bào thận chuột lang mới sinh đã công nghệ hóa để tiết ra CNTF. Các tế bào đã giải phóng một liều đáng kể CNTF vào HTKTƯ mà không có các hiệu ứng phụ (sút cân) như đã thấy khi thử nghiệm CNTF lần đầu. Các thử nghiệm cơ bản này đã chứng minh được rằng, các yếu tố DDTK có thể được chuyển giao liên tục trong dịch não tủy (cerebrospinal fluid – CSF) người bằng GTL *ex vivo* và vì thế đã hé ra những con đường mở rộng trong việc điều trị các bệnh thần kinh.

Thử nghiệm đầu tiên của GDNF đối với Parkinson đã được Amgen thông báo vào tháng 8 năm 1996. Thử nghiệm khởi đầu này là khảo sát hiệu ứng sự tồn tại tiềm tàng của GDNF

trên các neuron dopamine trên các mô hình động vật nhằm xác định tính an toàn và sự dung nạp của GDNF ở các bệnh nhân để làm giảm nhẹ bệnh Parkinson.

Có nhiều thử nghiệm lâm sàng đang được tiến hành với việc sử dụng các yếu tố DDTK cho các bệnh thần kinh ngoại biên (các bệnh thuộc chức năng vận động và cảm giác ở ngoại biên). Mặc dầu thực tế không có bằng chứng trực tiếp về sự biểu hiện DDTK bất thường có liên quan tới bệnh lý thần kinh, nhưng rõ ràng rằng một số yếu tố xác định có tác động trong lâm sàng. NGF là niềm hy vọng cho các bệnh nhân có bệnh lý thần kinh ngoại biên liên quan tới đái tháo đường – một bệnh có tác động tới các neuron cảm giác làm cho người bệnh luôn mệt mỏi, tê cứng chân tay và các cảm giác bất thường như bồn chồn hay nóng nẩy, dễ bị tổn thương và khó lành các vết thương. Các thử nghiệm pha II dành cho các bệnh nhân đái tháo đường sử dụng NGF để xử lý các bệnh lý ngoại biên, kết quả cho thấy cải thiện đáng kể chức năng thần kinh trong các cảm giác nóng, lạnh (được khảo sát bằng các test chức năng thần kinh). Trên cơ sở đánh giá hệ thần kinh ngoại biên (PNS) và những kết quả hiện tại từ các thử nghiệm lâm sàng thì các bệnh lý thần kinh có thể được trị liệu hiệu quả với các yếu tố DDTK.

Từ các thử nghiệm lâm sàng này, rõ ràng là các mô hình động vật hiện tại của chúng ta chưa thể hiện được trọn vẹn các vấn đề. Như đã đề cập ở trên, khi HTKTƯ động vật được xử lý với các yếu tố DDTK đã cho những kết quả rất tốt trong việc bảo vệ và phục hồi các chức năng thần kinh. Nhưng khi ứng dụng và kiểm định lại trong các thử nghiệm lâm sàng thì lại là một hình ảnh rất khác biệt. Tuy nhiên, việc sử dụng các yếu tố là một nhóm tác nhân được lý hoàn toàn mới mà các thông số về sự tác động phân tử và tế bào vẫn chưa có, tất nhiên theo thời gian các nhà khoa học lâm sàng và thực nghiệm dần dần sẽ làm thỏa mãn được các vấn đề mà hiện nay đang còn là hy vọng.

18.8 Những vấn đề cần quan tâm trong tương lai

Khung nhận thức về GTL hệ thần kinh được phác thảo từ nhiều khía cạnh. Rõ ràng là những tiến bộ đạt được hiện nay trong sinh, y học phân tử đã xác nhận mục tiêu GTL hệ thần kinh trung ương là hoàn toàn hiện thực. Chúng ta cũng đã xác định được nhiều điều kiện để kéo dài sự tồn tại của các neuron, giới hạn sự thoái hóa và mất chức năng neuron. Sự biểu hiện gen của các yếu tố DDTK chọn lọc hoặc các sản phẩm gen kháng apoptosis đã kéo dài đáng kể sự tồn tại và phát triển của các neuron.

Mặc dầu chúng ta đã phát triển nhiều chiến lược chuyển gen nhằm bảo vệ hệ thần kinh *ex vivo* và *in vivo* trên mô hình động vật, nhưng các mô hình hiện tại chưa phải là đại diện lý tưởng cho các bệnh thoái hóa thần kinh tương tự trên người. Vì thế các mô hình trên động vật cần phải phát triển xa hơn nữa và được tinh lọc để tháo gỡ hết tính phức tạp của sự mất chức năng HTKTƯ người. Rõ ràng là vẫn có một khoảng trống lớn giữa các kết quả thu được trong phòng thí nghiệm và việc áp dụng các chiến lược GTL để chống các bệnh thoái hóa thần kinh. Cũng có thể là một phân tử đơn hoặc các sản phẩm gen rất có chức năng trên các neuron HTKTƯ động vật thực nghiệm nhưng lại không thấy xuất hiện trên người. Một điều đơn giản là, tại thời điểm này chúng ta chưa có đủ kiến thức để xác định một cách chắc chắn nguyên nhân của các bệnh thần kinh cũng như chưa thiết lập được các công thức đặc hiệu của các sản phẩm gen để có thể chữa trị hoặc phòng ngừa được các bệnh như Alzheimer, ALS hoặc MS. Khi những hiểu biết của chúng ta về các cơ chế bệnh học thần kinh được nâng lên, lúc đó mới có thể tiến hành một cách song song các thí nghiệm đánh giá hiệu lực của các sản phẩm gen mới trong hệ thần kinh đồng thời nâng cao hiệu lực của các trị liệu ghép trong HTKTƯ.

Hiện tại chúng ta còn hiểu rất ít về điều hòa biểu hiện gen bởi các vec tơ virus. Khi các gen được chuyển tới hệ thần kinh thì thường thấy hiện tượng điều hòa xuống. Vì thế chúng ta cần phải xác định các yếu tố gây ảnh hưởng và kiểm soát mức độ biểu hiện gen *in vivo*. Tương tự như vậy các đặc trưng của các promoter đặc hiệu tế bào và các promoter cảm ứng sẽ nâng cao hơn khả năng sử dụng của các vec tơ trong hệ thần kinh. Tuy nhiên, cũng có đáp ứng miễn dịch với các vec tơ (đặc biệt là các vec tơ retrovirus tái tổ hợp) ở chính thời điểm chuyển gen. Tính an toàn của các vec tơ dùng cho các mục đích lâm sàng vẫn luôn được đặt ra trong GTL bởi vì vẫn có sự tiềm ẩn về các hoạt hóa gây tác hại do sự hỗ trợ hoặc tổ hợp với các virus thể hoang dã tiềm ẩn.

Cũng giống như các GTL khởi đầu, các quy trình được sử dụng đều nhằm mục đích làm chậm lại tốc độ thoái hóa thần kinh trong Parkinson và Alzheimer. Hy vọng sẽ có những tiến bộ trong trị liệu với các yếu tố DDTK cho các bệnh lý thần kinh ngoại biên. Tuy nhiên, cũng giống như GTL, những hiểu biết của chúng ta về các mô hình trị liệu chỉ mới ở giai đoạn đầu. Tuy nhiên, công nghệ GTL có thể làm tan biến các hội chứng thoái hóa thần kinh cho người bệnh, nhưng không vì thế mà chúng ta không nhận thức được những hạn chế của các phương pháp trị liệu đương thời này. Tất cả những khó khăn vẫn ở phía trước và chúng ta còn phải cố gắng không ngừng.

Chương XIX

ĐIỀU TRỊ BỆNH U NÃO

19.1 Mở đầu

Cả các khối u sơ cấp và các khối u đã di căn đều là những nguyên nhân chính gây nên bệnh trạng và sự chết chóc trong quần thể dân cư nói chung. Các khối u thần kinh đệm tế bào hình sao của não như đa u nguyên bào xốp ác tính (malignant glioblastoma multiforme –GBM) là dạng u não sơ cấp thường gặp nhất. Mặc dầu được trị liệu tấn công mạnh mẽ với các phương pháp như phẫu thuật cắt bỏ, bức xạ liều cao sau phẫu thuật và hóa trị liệu, nhưng tiên lượng của các bệnh nhân đa u nguyên bào xốp (GBM) là rất xấu. Vì thế, các nhà nghiên cứu đang nỗ lực phát triển nhiều phương pháp trị liệu thực nghiệm mới. Tuy nhiên, chưa có phương pháp nào có thể làm thay đổi đáng kể cho tiên lượng âm ảm này của các bệnh nhân GBM (Culver và cộng sự., 1996).

Ngoài các khối u ở não, hệ thần kinh trung ương (CNS) cũng là nơi hay bị di căn ác tính hệ thống. Trên thực tế các di căn não chiếm 25-30% trong tổng số 1,1 triệu trường hợp ung thư mới hàng năm tại Hoa Kỳ. Các khối u hay di căn lên não là u hắc sắc tố, ung thư phổi, vú, trực tràng và ung thư tế bào thận. Phẫu thuật kết hợp với trị xạ là cách điều trị được chọn cho các u não di căn đơn có thể tiếp cận được bằng phẫu thuật. Khi kết hợp 2 phương thức này thì có thể kéo dài thời gian sống được 40 tuần. Đáng tiếc là hầu hết các bệnh nhân đều là đa thương tổn và/hoặc khối u lại nằm ở các vị trí không thể can thiệp được bằng phẫu thuật khi đó chỉ áp dụng được phương pháp xạ trị và như thế thì chỉ kéo dài được 15 tuần lễ.

Mặc dầu trong thập kỷ qua đã có nhiều tiến bộ trong y học, trị liệu phóng xạ và hóa trị liệu đã cải thiện được phần nào về tiên lượng cho các bệnh nhân GBM và các khối u di căn trên HTKTƯ. Đã có những cách tiếp cận mới trong việc chuyển gen nhằm loại bỏ một cách

chọn lọc các tế bào khối u, điều đó có lợi cho việc điều trị các khối u não. Hy vọng rằng sự phát triển xa hơn nữa các chiến lược GTL mới sẽ tiêu hủy được các tế bào ác tính trong HTKTU và cải thiện đáng kể các tiên lượng của u não.

19.2 Nhân tố cơ bản của các thí nghiệm trị liệu gen với u não

Hiện nay có 4 cách tiếp cận đã được phê chuẩn cho các thử nghiệm lâm sàng (Bảng 19.1). Nhìn chung đều dựa trên cơ sở các gen nhạy cảm chọn lọc với các thuốc không độc khác (tức là gen thymidine kinase của virus herpes simplex - HSV-TK gen). Các gen này làm thay đổi tính sinh miễn dịch của khối u bằng cách tiết ra các cytokine từ nguyên bào sợi đồng loại đã tải nạp trộn lẫn với các tế bào khối u bản thân hoặc chỉ với các tế bào khối u đã tải nạp. Khi các yếu tố gây khối u bị ức chế thì sẽ làm kìm hãm đáp ứng miễn dịch của vật chủ (antisense yếu tố tăng trưởng insulin type I [IGF-1], antisense yếu tố tăng trưởng biến nạp 1 (antisense transforming growth factor [IGF-1] và gen kháng đa thuốc type I -(multiple drug resistance type I -MDR1) trong các tế bào gốc tạo máu [hematopoietic stem cell-HSC]) và bảo vệ chúng khỏi bị ngộ độc bởi hóa trị liệu hệ thống. Bốn thể loại này có thể được áp dụng một cách đơn lẻ hoặc tổ hợp với nhau để tạo nên những cơ hội độc quyền phá hủy các tế bào khối u gốc khi chúng đã trốn thoát khỏi các phương pháp trị liệu tiêu chuẩn.

Bảng 19.1 Các phương pháp đã được phê chuẩn được dùng trong các thử nghiệm GTL bệnh u não.

*cài gen “nhạy cảm” HSV-TK vào trong các tế bào u *in vivo* sau đó đưa ganciclovir vào qua đường tĩnh mạch.

*Nâng cao tính sinh miễn dịch khối u bằng cách chuyển các gen cytokine *ex vivo* rồi tiêm lại dưới da.

*Ức chế các chất kiểm chế miễn dịch từ khối u nhờ chuyển các gen antisense *ex vivo* vào trong các tế bào khối u bản thân sau đó cấy lại dưới da.

*Bảo vệ các tế bào tạo máu khỏi hiệu ứng ngược của hóa trị liệu hệ thống sau đó chuyển gen MDR1 qua trung gian retrovirus.

19.3 Các thử nghiệm GTL đã được phê chuẩn với việc sử dụng gen HSV-TK đối với các u não

19.3.1 Gen nhạy cảm HSV-TK

Gen HSV-TK được phân dòng đầu tiên năm 1979 từ virus type I (Cobere-Garapin và cộng sự., 1979). Hiện nay gen này là gen nhạy cảm được sử dụng chủ yếu trong các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng vì nó tiêu hủy được tế bào đích mà hạn chế được độc tính mô không đặc hiệu. HSV-TK xúc tác cho sự monophosphoryl hóa một số thuốc kháng herpes như acyclovir (ACV) và ganciclovir (GCV) mà FDA đã phê chuẩn (Balzarini và cộng sự., 1995; Cheng và cộng sự., 1983; Elion, 1980; Faulds và Heel, 1990). Enzyme kinase tế bào này sau đó lại chuyển đổi các dạng monophosphate (MP) của thuốc thành diphosphate (DP) và triphosphate (TP), những hợp chất này có thể hợp nhất vào DNA vì nó tương tự như một nucleoside. ACV-TP và GCV-TP ức chế DNA polymerase do đó dẫn đến làm phân đoạn DNA. Vì lý do này nên khi tế bào thâm nhiễm HSV thì nó sẽ phơi bày ACV hoặc GCV - một sản phẩm thuốc hợp nhất đã phosphoryl hóa dẫn đến sự phân đoạn DNA và apoptosis, vì thế mà giết chết các tế bào thâm nhiễm HSV (Samejima và Meruelo,

1995; Smee và cộng sự., 1983; Terry và cộng sự., 1991). Ngược lại các TK tế bào vật chủ thì không phosphoryl hóa ACV hoặc GCV do đó mà làm giới hạn độc tính tế bào (Field và cộng sự., 1983).

Một phương pháp tương tự dùng để tiêu hủy các tế bào ác tính (Moolten, 1980) là chuyển gen HSV-TK vào các tế bào khối u *in vitro* trên chuột, kết quả là các tế bào này bị tiêu hủy khi chúng được xử lý với ACV hoặc GCV *in vitro* hoặc sau khi cấy ghép lại vào chuột (Moolten và cộng sự., 1990). GCV có hiệu ứng kháng u tiềm năng hơn ACV và các chất tương tự khác trong hệ thống các mô hình khối u trên động vật (Smee và cộng sự., 1985). Điều này có thể do sự hấp thụ cao hơn của GCV vào trong các tế bào thâm nhiễm HSV và thực tế là GCV là cơ chất tốt cho cả enzyme kinase virus và kinase vật chủ. Trong khi đó sự phosphoryl hóa lại là tối thiểu ở các tế bào âm tính với HSV-TK (Cheng và cộng sự., 1983).

Phương pháp tiêu hủy tế bào này đòi hỏi các tế bào phải đang ở trạng thái phân chia tích cực thì mới hợp nhất được với các dẫn suất triphosphate trong DNA tế bào (Cheng và cộng sự., 1994). Vì các tế bào khối u thường là phân chia tích cực nhất trong hầu hết các mô nên đặc tính này đã được tận dụng để tiêu diệt chúng *in vivo*. Trên cơ sở các nghiên cứu lâm sàng này cũng như trên thực tế GCV đã được FDA phê chuẩn cho việc điều trị thâm nhiễm HSV nên GCV đã được phép sử dụng riêng cho việc chuyển gen HSV-TK vào người trong các thử nghiệm GTL lâm sàng.

19.3.2 Khảo sát các phương pháp chuyển gen cho các khối u ở thần kinh trung ương

Sự chuyển gen đã được thực hiện rộng rãi *ex vivo* và *in vivo*. Cả *ex vivo* (truyền gen ngoài cơ thể) và *in vivo* (truyền gen bên trong cơ thể) đều đã được phê chuẩn cho các thử nghiệm lâm sàng với u não (Bảng 19.2). Cách tiếp cận *ex vivo* thì sử dụng phương pháp electroporation, liposome và các vec tơ retrovirus của chuột. Các thử nghiệm *in vivo* thì sử dụng các vec tơ adenovirus và retrovirus. Nói một cách chung chung là *ex vivo* hướng vào việc nâng cao tính sinh miễn dịch của khối u trong khi đó *in vivo* lại hướng vào việc chuyển gen nhạy cảm vào trong các khối u. Chúng ta sẽ đề cập chi tiết vấn đề này sau.

Bảng 19.2 Những nét chính được phê chuẩn bởi Ủy ban cố vấn sinh học (RAC) cho các thử nghiệm GTL bệnh u não

Gen chuyển	Phương pháp chuyển gen	Loại mô chuyển	Dạng sơ cấp của hiệu ứng kháng u
HSV-TK	Qua trung gian retrovirus	<i>In vivo</i> (khối u)	Cảm ứng apoptosis
HSV-TK	Qua trung gian adenovirus	<i>In vivo</i> (khối u)	Cảm ứng apoptosis
IL-2	Cơ sở plasmid	<i>Ex vivo</i> (nguyên bào sợi)	Miễn dịch học
IL-4	Qua trung gian retrovirus	<i>Ex vivo</i> (khối u)	Miễn dịch học
Antisense IGF-1	Thâm chuyển plasmid với liposome	<i>Ex vivo</i> (khối u)	Miễn dịch học
Antisense TGF- β	Thâm chuyển plasmid với liposome	<i>Ex vivo</i> (khối u)	Miễn dịch học
MDR-1	qua trung gian retrovirus	<i>Ex vivo</i> (HSV)	Hóa trị liệu

19.3.3 Chuyển gen nhạy cảm HSV-TK qua trung gian retrovirus *in vivo*

Các vector retrovirus của chuột là “con ngựa thồ” cho việc chuyển gen trong những năm đầu của các thực nghiệm GTL trên người (Culver, 1996). Lý do cơ bản là khả năng hợp nhất ổn định các gen vec tơ của chúng (tải nạp), nó cho phép biểu hiện một cách tiềm tàng trong suốt đời sống của các tế bào cũng như ở tất cả các thế hệ con cháu (Miller, 1990). Tuy nhiên, trong trường hợp điều trị u não thì chúng được hấp dẫn một cách đặc biệt bởi vì chúng đòi hỏi tế bào phải đang phân chia thì mới tải nạp thành công (Miller và cộng sự., 1990). Vì khối u là các tế bào tăng sinh mạnh nhất trong não nên có thể chuyển giao khá chọn lọc các vec tơ vào trong các tế bào khối u, đặc biệt là trong não nơi cư trú của quần thể tế bào có chỉ số tăng sinh thấp (Culver và cộng sự., 1992).

Việc chuyển gen HSV-TK bởi các vec tơ retrovirus là ưu việt nhất đối với các thử nghiệm lâm sàng các khối u, gồm 9 thử nghiệm pha I và II ở Hoa Kỳ và 3 thử nghiệm khác ở Âu Châu (Bảng 19.3). Trong các quy trình này, nguyên bào sợi của chuột (murine fibroblast) (các tế bào NIH 3T3) được công nghệ hóa để sản xuất ra các vec tơ retrovirus chuột (các tế bào tạo vec tơ – vector producer cell –VPC) sẽ được cấy trực tiếp vào các khối u não đang phát triển trên các bệnh nhân. Các HSV-TK sẽ được chuyển tới xung quanh các tế bào u não của bệnh nhân. Phương pháp chuyển gen này đã được chấp nhận vì nếu tiêm trực tiếp các hạt vec tơ đơn thì sẽ cho hiệu ứng chuyển gen thấp (1-3%), trong khi đó nếu tiêm VPC thì hiệu ứng sẽ là 10-55% trên các mô hình động vật (Ram và cộng sự., 1993).

Bảng 19.3 Các đặc trưng của các thử nghiệm lâm sàng chuyển gen nhạy cảm HSV-TK in vivo qua trung gian retrovirus

Tác giả nghiên cứu	Trung tâm nghiên cứu	Thiết kế thử nghiệm	Dạng khối u
Oldfield	NIH	Stereotactic	Di căn sơ cấp và tái diễn
Van Gilder	Đại học Iowa và 4 trung tâm khác	Kết hợp với phẫu thuật cắt bỏ	GBM tái diễn
Rafel	Mayo Clinic và 3 trung tâm khác tại Hoa Kỳ	Kết hợp với phẫu thuật cắt bỏ	Khối u tiến triển hoặc tái diễn
Kun	St. Jude Children's Research Hospital	Stereotactic	Khối u tiến triển hoặc tái diễn
Oldfield	NIH	Tiêm trực tiếp	Ung thư màng não mềm
Fetell	Đại học Colombia và 4 trung tâm khác ở Hoa Kỳ và Israel	Stereotactic	GBM tái diễn và u tế bào hình sao thoái biến
Harsh	Đại học Harvard	Stereotactic	U thần kinh đệm
Maria	Đại học Florida và hơn 40 trung tâm khác tại Hoa Kỳ, Canada và Âu Châu	Kết hợp với phẫu thuật cắt bỏ (thử nghiệm pha II ngẫu nhiên, có khả	GBM mới được chẩn đoán nhưng chưa được điều trị

Maria	Nhiều trung tâm	năng xảy ra) Kết hợp với phẫu thuật cắt bỏ (thử nghiệm pha II ngẫu nhiên, có khả năng xảy ra	GBM tái diễn
Izquierdo Klatzmann	Madrid Tây Ban Nha Paris, Pháp	Stereotactic Kết hợp phẫu thuật cắt bỏ	GBM tái diễn GBM tái diễn
Yla-Herttuala	Kuopio, Phần Lan	Tiêm trực tiếp	GBM tái diễn

Những cải tiến trong hiệu ứng chuyển gen đã đem lại những thành quả đáng kể vì nếu trị liệu tiếp tục với GCV thì sẽ tiêu hủy hoàn toàn khối u trong các động vật đã được tiêm VPC mà không thấy bằng chứng nào về độc tính của các vec tơ retrovirus (Ram và cộng sự., 1993). Các động vật có khối u đang phát triển sẽ được tiêm các hạt vec tơ đơn vào tận khối u. Ý nghĩa đặc biệt là trên các thực nghiệm trên chuột người ta đã chứng minh được rằng có ít nhất 10% tế bào khối u có gen HSV-TK nhưng đã có trên 50% khối u có thể được loại trừ hoàn toàn (Culver và cộng sự., 1993). Hiện tượng này có liên quan tới sự hủy hoại các tế bào khối u liên kế không có HSV-TK và được gọi là hiệu ứng giết khối u của “người ngoài cuộc” (bystander).

Nguyên do của hiệu ứng người ngoài cuộc chưa được làm rõ hoàn toàn. Nhiều khả năng là kết quả của sự chết theo chương trình của tế bào (apoptosis), hoặc do chuyển các chất chuyển hóa của GCV tới các tế bào lân cận thông qua các khớp nối gián đoạn (Bi và cộng sự., 1993; Colombo và cộng sự., 1995; Fick và cộng sự., 1995), hay do sự hấp thụ các phân đoạn tế bào từ các tế bào đã bị hủy hoại – HSV-TK/GCV (Freeman và cộng sự 1993) và do cảm ứng đáp ứng miễn dịch của vật chủ (Gagandeep và cộng sự., 1996). Rất có thể có 3 tới giả thiết tác động đồng thời *in vivo*. Tuy nhiên, các nghiên cứu *in vitro* đã chứng minh rằng bộ phận chính của hiệu ứng người ngoài cuộc là sự chuyển GCV dạng phosphoryl hóa qua các khớp nối gián đoạn để vào các tế bào khối u liên cạnh (Culver, 1996).

Sau khi hoàn tất các nghiên cứu về độ an toàn, hiệu ứng tiền lâm sàng và đã được sự phê chuẩn của ủy ban điều hòa quốc gia và địa phương, một quy trình GTL cho u não lần đầu tiên với hệ thống chuyển gen này đã được thực hiện ở Viện sức khỏe Quốc gia tại Bethesda, Maryland vào tháng 12 năm 1992 (Oldfield và cộng sự., 1993). 15 bệnh nhân GBM tái hồi hoặc có các khối u đã di căn được xử lý bằng cách tiêm lập thể HSV-TK vào nhiều vùng của khối u (Ram và cộng sự., 1997). Phải nhấn mạnh rằng tất cả những bệnh nhân này đều đã thất bại với tia xạ, phẫu thuật hay hóa trị liệu. Mỗi bệnh nhân đều được tiêm lập thể $0,5-1 \times 10^9$ VPC, nhưng không thấy có bằng chứng gì về độc tố do các tế bào ghép khác loại hoặc do xử lý với GCV. Sau một tuần tiêm VPC, các bệnh nhân lại được điều trị với liệu trình 14 ngày bằng GCV qua đường tĩnh mạch. Trong thử nghiệm pha I khởi đầu này cần nhấn mạnh là để xác định độ an toàn của phương pháp trị liệu, vì thế VPC chỉ được tiêm vào phần tăng cường - gadolinium của khối u (gadolinium –enhancing portion) sao cho những biến đổi trong khối u và vùng xung quanh não có thể thấy được qua cộng hưởng từ. Nói theo cách khác là không chủ đích xử lý toàn bộ khối u ở bất kỳ bệnh nhân nào. Sự chuyển gen được xác định là có xảy ra nhưng ở mức độ thấp (<1%)

nhờ phương pháp lai *in situ* nhuộm đối (counterstained) với thuốc nhuộm GFP đặc hiệu khối u. Cũng không thấy phản ứng đối ngược nào liên quan tới việc tiêm trực tiếp VPC khác loại và không có phản ứng viêm đáng kể nào thấy ở sinh thiết hay khi mổ xác.

Bốn trong số 13 bệnh nhân được khảo sát cho thấy có hiệu ứng kháng u > 50% (khảo sát trên cơ sở kích cỡ phần tăng cường gadolinium của khối u). Sự biến đổi về kích cỡ đi kèm với các biến đổi u nang bên trong khối u. Phát hiện này đã chứng minh rằng, có một hiệu ứng chuyển gen thấp và không có phản ứng viêm, hiệu ứng người ngoài cuộc cũng giống như phẫu thuật ở một số bệnh nhân. Mặc dầu vùng điều trị của khối u được giới hạn nhưng đã có 3 bệnh nhân sống được hơn 12 tháng sau GTL, một bệnh nhân bị u nguyên bào xốp tái diễn đã mất hết u trên 5 năm sau GTL. Lý do của những kết quả đặc biệt này hiện vẫn chưa rõ. Vì chúng ta đều biết rằng những bệnh nhân bị u nguyên bào xốp tái diễn nói chung chỉ hy vọng sống được 5,8 tháng (mức trung bình là 3,4 - 8,8 tháng) nên với kết quả này chúng ta hy vọng sẽ có cách tiếp cận tối ưu hơn nữa với việc điều trị GBM (Florell và cộng sự., 1992). Vì không có độc tính lại kích thích đáp ứng miễn dịch kháng u nên các thử nghiệm lâm sàng này đã được phê chuẩn ở Hoa Kỳ cho phép cải tiến nâng cấp các thử nghiệm của NIH thiết kế cho việc cấy ghép HSV-TK VPC và GPC (Bảng 19.3).

Cải tiến đầu tiên là việc kết hợp giữa phẫu thuật cắt bỏ khối u và chuyển gen sẽ tốt hơn là tiêm lập thể (Culver và cộng sự., 1993). Không giống như thử nghiệm đầu tiên ở NIH, sự thiết kế ở đây nhằm vào việc chuyển VPC vào những vùng không cần cắt bỏ của khối u thẩm nhập (infiltration). Khối u được cắt bỏ tối đa (với các khối u tái phát thì khó có thể cắt bỏ hoàn toàn), sau đó tiêm 1×10^9 VPC sâu 1 cm xung quanh khối u vì phần lớn các khối u thẩm nhập đều ở vùng này. Một bộ phận (bể) chứa Ommaya được đặt hẳn vào giữa khối u. Hai tuần sau phẫu thuật, bệnh nhân được nhận thêm VPC thông qua bể chứa Ommaya để chuyển gen vào tận các tế bào u gốc.

Những kết quả bước đầu thu được từ các thử nghiệm pha II này cho thấy có những rủi ro liên quan tới việc tiêm VPC vào bể chứa Ommaya. Điều này thể hiện ở chỗ nếu VPC bị rò rỉ ra xung quanh ống thông Ommaya vào vùng dưới màng nhện thì bệnh nhân sẽ phải chống đỡ với một phản ứng màng não cấp như sốt cao, co cứng cổ, đau đầu dữ dội và tăng huyết áp nghiêm trọng. Phản ứng này rồi sẽ tự giới hạn lại và có thể đáp ứng bằng cách điều trị với các thuốc giảm đau, các glucocorticoid và các thuốc chống tăng huyết áp. Lưu ý quan trọng là những phản ứng trái ngược này không liên quan gì tới sự chuyển gen mà nó chỉ là một phản ứng sinh lý trực tiếp do truyền các tế bào ghép khác loại vào cơ thể. Những hiệu ứng phụ này không thể dự đoán được khi tiêm trực tiếp VPC vào khoảng không dưới màng nhện của khỉ (Ram và cộng sự., 1993). Những cải tiến trong thiết kế bao gồm tiêm technetium vào Ommaya trước khi tiêm VPC để xác định rằng hốc phẫu thuật cắt bỏ đã được đánh dấu. Các bệnh nhân thuộc diện nghiên cứu đã được chuyển tới trường đại học Iowa (Iowa city), trường Đại học California, San Francisco, Đại học Washington (Seattle), Đại học Texas –Southwestern (Dallas) và Đại học Cincinnati. Các thông tin đều được công khai và vị đại diện hội nghị đã vạch rõ việc tiêm trực tiếp VPC ngay sau phẫu thuật cắt bỏ là an toàn. Một công trình nghiên cứu song song khác ở người trưởng thành cũng thông báo rằng việc chuyển gen stereotactic giống như các nghiên cứu khởi đầu của NIH, vẫn chưa có những số liệu công bố về khả năng của 2 thử nghiệm này.

Hai thử nghiệm đã được phê chuẩn áp dụng cho trẻ em và lứa tuổi thanh niên từ 3-21 tuổi. VPC được chuyển bằng cách tiêm lập thể hoặc kết hợp với phẫu thuật cắt bỏ (Kun và cộng sự., 1995) và tiêm trực tiếp VPC vào những vùng không cắt bỏ được của khối u (recurrent supratentorial tumor) (Rafel và cộng sự., 1994). Với liều lượng giữa 1×10^8 và

2×10^9 VPC sẽ được tiêm vào nhiều vị trí trong khối u. Các trung tâm có liên quan tới các thử nghiệm trên trẻ em gồm Mayo clinic (Rochester, MN), St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN), Đại học Washington, trung tâm Y học Quốc gia về trẻ em (Washington DC) và Viện nhi Los Angeles cùng với các trung tâm Wurzburg và Dusseldorf ở Đức.

Trong khi chưa có số liệu nào về các nghiên cứu này được công bố thì một công ty đỡ đầu là Genetic Therapy Inc. (GTI) đã có 2 thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên pha II mở đối với người lớn cho các bệnh nhân mới được chẩn đoán mà trước đây chưa được điều trị GBM và GBM hồi quy. Trong nhóm mới được chẩn đoán, các bệnh nhân sẽ được nhận ngẫu nhiên (mỗi nhóm có 123 bệnh nhân) hoặc trị liệu bằng phẫu thuật cắt bỏ và tia xạ bên ngoài hoặc phẫu thuật cắt bỏ và tiêm trực tiếp VPC vào các vùng u gốc sau đó tia xạ bên ngoài và trị liệu với GCV 14 ngày sau khi tiêm VPC. GCV được sử dụng trong 14 ngày nhưng bộ phận tái xử lý của bể chứa Ommaya trong nghiên cứu này đã được loại bỏ do có các phản ứng trái ngược ở hầu khắp các vị trí thử nghiệm. Việc phê chuẩn thử nghiệm ngẫu nhiên này đối với các bệnh nhân mới được chẩn đoán, chưa được xử lý khối u đã chứng tỏ rằng các chỉ số an toàn và khả năng kháng u quan sát thấy ở các thử nghiệm trước đã đủ để thuyết phục FDA cho phép thực hiện các nghiên cứu mới này. Những thử nghiệm này có sự tham gia của ít nhất 40 trung tâm ở Bắc Mỹ, Âu Châu và Israel (Bảng 19.3).

Ngoài việc phát triển các thử nghiệm bảo trợ GTI còn có nhiều thử nghiệm khác ở Hoa Kỳ và Âu Châu (Klatzmann và cộng sự., 1996) với việc cấy ghép HSV-TK VPC và GCV (Bảng 19.3). Chẳng hạn như Harsh và cộng sự ở Boston đã tiêm VPC với cách thức leo thang liều lượng, bắt đầu với 3 vị trí khác biệt trong khối u, mỗi vị trí có 5×10^5 tế bào VPC ở thời điểm mà sinh thiết khẳng định là đang tái phát. 5 ngày sau, bệnh nhân được tiêm đơn GCV vào chỗ phẫu thuật, kết quả là các khối u đã được loại bỏ tối đa. Mục đích cơ bản của nghiên cứu pha I này là đánh giá mật độ, phạm vi và các dạng tế bào đã được tải nạp với phương pháp chuyển gen.

Các phương pháp chuyển gen bao gồm tiêm lập thể vào khối u hoặc kết hợp phẫu thuật cắt bỏ và tiêm trực tiếp như đã trình bày ở trên. Những kết quả thu được từ những thử nghiệm này đã được xuất bản (Izquierdo và cộng sự., 1996). 5 bệnh nhân được tiêm HSV-TK VPC không có phẫu thuật cắt bỏ. Một trong số các bệnh nhân này được thông báo là giảm đáng kể thể tích khối u trong thùy đã tiêm VPC. Những kết quả này có thể so sánh với các kết quả từ các thử nghiệm pha I khởi đầu được chỉ đạo ở NIH.

Quy trình được phê chuẩn cuối cùng là chuyển gen HSV-TK *in vivo* bằng cách tiêm VPC thiết kế riêng cho việc điều trị ung thư di căn màng não (Oldfield và cộng sự., 1995). Thiết kế thử nghiệm này liên quan tới việc tiêm trực tiếp HSV-TK VPC vào hệ thất của TKTƯ thông qua ống thông Ommaya với liều lượng leo thang. Một bệnh nhân được điều trị ở NIH sử dụng liều khởi đầu là 1×10^9 VPC. Đáng tiếc là bệnh nhân này lại phát triển phản ứng màng não (co cứng cơ) nghiêm trọng, đau cổ và lưng, buồn nôn, rét run và sốt nên buộc phải dừng nghiên cứu. Các phản ứng trái ngược này không thể dự đoán được trên cơ sở các nghiên cứu trên động vật trước đây (Oshire và cộng sự., 1995). Phản ứng này có liên quan tới hậu quả của sự kích thích dòng tế bào ở khoảng không dưới màng nhện bởi VPC chuột như đã thấy trong các thử nghiệm u não có sử dụng bể chứa Ommaya. Thử nghiệm này hiện nay không còn tiếp tục nữa. Về vấn đề này, chúng ta thấy rằng các nghiên cứu đã có một chỉ giới về độ an toàn với phương pháp chuyển gen. Có

thể là chỉ với hiệu ứng kháng u cũng đã đủ ý nghĩa để cho phép mở rộng các nghiên cứu GTL u não pha II và III trên khắp thế giới.

19.3.4 Chuyển gen nhạy cảm HSV-TK *in vivo* qua trung gian adenovirus

Các vec tơ adenovirus cũng được phê chuẩn cho chuyển gen HSV-TK vào các khối u ở HTKTU *in vivo* (Bảng 19.2). Adenovirus có rất nhiều lợi thế với tư cách là các vec tơ chuyển gen như được sản xuất ra với độ chuẩn cao, có khả năng thâm nhiễm hầu hết các dạng tế bào người với hiệu ứng cao trong đó có cả các tế bào của HTKTU (Le Gal La Salle và cộng sự., 1993) và không đòi hỏi đích là các tế bào tăng sinh. Điều này rất quan trọng bởi vì nhiều tế bào khối u trong GBM tiến triển là không tích cực tăng sinh ở bất kỳ thời điểm nào vì thế mà các vec tơ retrovirus không sử dụng được (Yoshii và cộng sự., 1986). Trên cơ sở những hiểu biết này, các vec tơ adenovirus tái tổ hợp chứa gen HSV-TK đã được tiêm vào các động vật mô hình u não như trong các thí nghiệm vec tơ retrovirus đã đề cập ở trên (Chen và cộng sự., 1994; Colak và cộng sự., 1995). Những kết quả này cũng tương tự như sự chuyển gen VPC *in vivo*, nó tiêu hủy hoàn toàn khối u ở một số động vật khi mà các mô xung quanh bình thường đã được thâm nhiễm với vec tơ này (Chen và cộng sự., 1994). Các tế bào bình thường được bảo vệ lớn hơn là dự đoán bởi vì các vec tơ có thể tải nạp cả mô ác tính lẫn không ác tính. Điều này có liên quan tới một thực tế là các dẫn suất phosphoryl hóa của GCV đòi hỏi phải là các tế bào tăng sinh thì mới cảm ứng gây chết tế bào được. Vậy là các promoter đặc hiệu mô lại không đòi hỏi như các giả thuyết gốc.

Tuy nhiên, hiệu ứng chuyển gen vào các khối u não vẫn còn tồn tại một vấn đề quan trọng là các vec tơ adenovirus chỉ thâm nhiễm các tế bào ở tại vùng được tiêm giống như các vec tơ retrovirus. Tuy nhiên, các vec tơ adenovirus lại biểu hiện HSV-TK ở mức cao hơn so với retrovirus trong cùng một dạng tế bào, vì thế nó có thể làm tăng đáng kể hiệu ứng trị liệu trực tiếp của chúng cũng như hiệu ứng giết tế bào khối u theo kiểu “người ngoài cuộc” (Chen và cộng sự., 1995; Shewash và cộng sự., 1994). Vì thế, việc sử dụng các vec tơ adenovirus có thể cho hiệu ứng kháng u cao hơn so với cùng liều GCV và có thể cho phép sử dụng GCV liều thấp hơn nếu độc tính của nó làm giới hạn các ứng dụng lâm sàng. Mặc dầu có các lợi thế như vậy nhưng vấn đề lớn vẫn chưa được giải quyết với vec tơ này là độc tính của chúng. Các nghiên cứu trên chuột và động vật cao cấp không phải người đã chứng minh rằng khi tiêm một lượng lớn các hạt vec tơ adenovirus tái tổ hợp vào trong mô não bình thường sau đó lại được xử lý bằng GCV thì có thể có các hiệu ứng phụ đáng kể và có thể cảm ứng sản xuất các kháng thể trung hòa (Byrnes và cộng sự., 1995; Goodman và cộng sự., 1996). Mô hình thiết kế lâm sàng cho các quy trình liều lượng leo thang như sau: bắt đầu với các liều lượng vec tơ rất thấp để tìm liều tối ưu cho trị liệu, thường là dưới mức cảm ứng gây độc tính cho động vật.

Có 3 thử nghiệm đã được phê chuẩn bởi RAC, một cho Đại học Pennsylvania (Philadelphia), một cho Đại học Baylor (Houston, TX) và một cho Mt. Sinai Medical center ở New York. Thử nghiệm tại Pennsylvania là 2 nhóm bệnh nhân u não tái diễn (Eck và cộng sự., 1996), trong đó 9 bệnh nhân bị tổn thương có thể tiếp cận bằng phẫu thuật và 9 bệnh nhân có tổn thương nhưng không tiếp cận được bằng phẫu thuật. Ba bệnh nhân của mỗi nhóm được điều trị với cùng liều lượng theo quy trình leo thang liều lượng nhờ việc tiêm lập thể vào nhiều vị trí trong khối u, liều khởi đầu là 10^9 hạt virus. GCV sẽ được đưa vào tĩnh mạch sau 2 ngày tiêm vec tơ. Những bệnh nhân có tổn thương mà không phẫu

thuật được sẽ được nhận GCV trong 14 ngày. Những bệnh nhân trong nhóm có thể phẫu thuật cắt bỏ sẽ có quy trình là 7 ngày sau khi tiêm adenovirus nhằm đảm bảo an toàn cho khối u. Một liều phụ của vec tơ sẽ được tiêm vào những vùng không thể phẫu thuật cắt bỏ và GCV sẽ được tiếp tục thêm 2 tuần lễ nữa. Tuy nhiên những số liệu này vẫn chưa được công bố.

Thử nghiệm ở Đại học Baylor là các bệnh nhân u tế bào hình sao tái diễn cao, các bệnh nhân GBM và những người có các khối u đã di căn. Tại thời điểm sinh thiết lập thể, bệnh nhân sẽ được tiêm các hạt vec tơ adenovirus vào khối u liều lượng leo thang khởi đầu với 1×10^8 hạt vec tơ. Năm bệnh nhân ở mỗi nhóm sẽ được khảo sát về độc tính và đáp ứng kháng u. Nếu liều lượng này được dung nạp tốt thì liều lượng sẽ được tăng dần tới cực đại là $1,5 \times 10^9$ hạt. Cũng chưa có số liệu nào được công bố.

Công trình nghiên cứu tại Mt. Sinai là các bệnh nhân u nguyên bào xấp ác tính tái diễn. Nhờ việc áp dụng quy trình phẫu thuật lập thể nên một khối lượng tối đa khối u đã được loại đi, sau đó tiêm các vec tơ adenovirus vào địa nơi phẫu thuật khởi đầu với 1×10^7 pfu. Sau 24 giờ sẽ được tiếp tục với liệu trình tiêm 7 ngày GCV qua tĩnh mạch. Nếu không thấy độc tính nghiêm trọng thì liều lượng vec tơ sẽ tăng lên 0,5 log. Cũng chưa có số liệu nào được công bố.

Với các nghiên cứu trên retrovirus thì yếu tố xác định cho phương pháp tiêm trực tiếp *in vivo* có thể là khả năng phân phối một cách đầy đủ gen HSV-TK vào các khối u và cho phép hiệu ứng người ngoài cuộc tiêu hủy hết các tế bào chưa được tải nạp còn sót lại.

19.3.5 Tải nạp *Ex vivo* gen IL-2 hoặc IL-4 của người vào trong nguyên bào sợi hoặc trong các khối u với các vec tơ retrovirus

Một trong hai thử nghiệm đầu tiên về GTL được thiết kế cho việc chuyển gen interleukin-2 (IL-2) vào nguyên bào sợi bản thân. Các nguyên bào sợi được chọn là đích cho các vectơ bởi vì chúng tăng trưởng dễ hơn các tế bào khối u của bệnh nhân khi nuôi cấy mô. Các nguyên bào sợi đã tải nạp sẽ được trộn lẫn với 1×10^7 tế bào khối u (không tải nạp) bản thân đã được chiếu xạ và tiêm dưới da 3 lần ít nhất trong 2 tuần. Số lượng nguyên bào sợi tải nạp sẽ leo thang từ $1,25 \times 10^6$ tế bào cho các bệnh nhân u nguyên bào xấp tái diễn. Các thí nghiệm trên động vật cho thấy khi tiêm vec tơ IL-2 biểu hiện khối u đồng gen vào chuột thì sẽ làm thoái lui khối u và phát triển tính miễn dịch đặc hiệu u (Fearon và cộng sự., 1990). Vì thế quy trình này được thiết kế như là một trị liệu bổ sung cho cách trị liệu bằng phẫu thuật GBM hiện nay. Thử nghiệm này đã được phê chuẩn cho việc thực nghiệm ở trung tâm ung thư khu vực San Diego với các bệnh nhân GBM tái diễn.

Quy trình thứ hai được phê chuẩn cho việc chuyển gen cytokine được thực hiện ở Đại học Pittsburgh. Các bệnh nhân u nguyên bào xấp tái diễn hoặc u tế bào hình sao (supratentorial anaplastic astrocytoma) có thể thích hợp với việc cắt bỏ không hoàn toàn. Các tế bào khối u sẽ được phát triển trong nuôi cấy và được tải nạp với một retrovirus của chuột mã cho gen IL-4 người. Sau khi tải nạp, các tế bào được công nghệ hóa này sẽ được đưa trở lại cho bệnh nhân với 5 lần tiêm trong 2 tuần. Cũng chưa có các số liệu nào được công bố về hiện trạng của 2 thử nghiệm này.

19.3.6 Chuyển gen antisense IGF-1 *ex vivo* với một vec tơ plasmid vào các tế bào khối u bản thân

Cách tiếp cận này nhằm điều trị các u não (Bảng 19.1). Các nhà khoa học đã sử dụng một plasmid sao chép virus Epstein –Barr (EBV) có chứa bản phiên mã antisense của gen IGF-1. Các nghiên cứu *in vitro* đã chứng minh rằng nếu cài một gen antisense IGF-1 vào trong các tế bào khối u sản xuất IGF-1 thì sẽ ức chế đáng kể sự sản xuất IGF-1 (Trojan và cộng sự., 1992). Khi tiêm những tế bào biến đổi gen vào các động vật đồng gen thì sẽ đảo thải miễn dịch cả tế bào biến đổi gen cũng như các tế bào khối u hoang dã (tiêm đồng thời vào chân và não). Sự tiêu hủy khối u là qua trung gian các tế bào T CD8⁺ (Trojan và cộng sự., 1992). Một thử nghiệm lâm sàng trên người cũng đã được phê chuẩn để điều trị cho những bệnh nhân u GBM đã trị xạ được thực hiện ở Đại học Case Western Reserve (Cleveland, OH). Nghiên cứu này được thiết kế cho việc sử dụng các tế bào khối u thu nhận từ sinh thiết trong khi phẫu thuật cắt bỏ. Các tế bào khối u đã được làm test về biểu hiện IGF-1 trong nuôi cấy mô. Nếu khối u có sản xuất ra IGF-1 thì các vec tơ plasmid sao chép sẽ được chuyển vào các tế bào khối u nhờ liposome cationic. Các tế bào này sẽ được chiếu xạ triệt để và tiêm vào dưới da theo quy trình liều leo thang, khởi đầu với 1 X 10⁷ tế bào. Gây miễn dịch chống đỡ ở tuần 4 và 12. Cũng chưa có số liệu nào được công bố.

19.3.7 Chuyển gen antisense TGF- β *ex vivo* vào trong các tế bào khối u

Chúng ta đều rõ rằng các u nguyên bào xộp có sản sinh ra các chất kiểm chế miễn dịch, một trong số đó là yếu tố tăng trưởng biến nạp β (transforming growth factor- β) (TGF- β). Các thí nghiệm về khối u trên chuột đã chứng minh rằng việc sản sinh ra hiệu ứng kháng u qua trung gian miễn dịch có thể được cảm ứng sau khi tiêm dưới da các tế bào khối u biểu hiện gen antisense TGF- β nhằm loại trừ tiết TGF- β từ các khối u (Fakhrai và cộng sự., 1996). Trong một quy trình lâm sàng liều leo thang đã được phê chuẩn (Bảng 19.2), các nhà khoa học sẽ cắt bỏ khối u của các bệnh nhân u nguyên bào xộp (đã được xác định bằng tổ chức học) và tiến hành thử nghiệm về sự tiết TGF- β của dòng tế bào này. Nếu các tế bào sản xuất TGF- β thì chúng sẽ được biến đổi gen với một plasmid có chứa gen antisense TGF- β nhờ electroporation. Khi TGF- β đã được điều hòa xuống đủ mức thì các tế bào này sẽ được chiếu xạ để đề phòng tái tăng trưởng trong các bệnh nhân và lại tiêm vào dưới da 3 tuần, mỗi tuần 4 liều. Tuy nhiên, cũng chưa có các số liệu nào được công bố.

19.3.8 Chuyển gen MDR-1 *ex vivo* vào trong các tế bào gốc tạo máu với các vec tơ retrovirus chuột

Thao tác gen với HSC về mặt lý thuyết thì cũng có thể bảo vệ được HSC khỏi các hiệu ứng độc của hóa trị liệu (Bảng 19.1). Điều này được thực hiện bằng cách cài gen MDR-1 vào trong các HSC trước khi dùng hóa trị liệu ức chế khối u với liều cao. MDR-1 là một phương pháp kháng khối u của các tác nhân hóa trị liệu vì nó bơm hết thuốc ra khỏi tế bào (Galski và cộng sự., 1989). Việc cài gen MDR-1 vào tủy xương chuột qua trung gian vec tơ retrovirus *ex vivo* đã thể hiện hiệu ứng bảo vệ HSC *in vivo* khi động vật được xử lý với liều cao taxol (Sorrent và cộng sự., 1992). Các thử nghiệm lâm sàng trên người cũng đã được phê chuẩn cho việc điều trị GBM tái diễn mới được chẩn đoán, các khối u não, u bạch huyết HTKTƯ sơ cấp, u thần kinh ngoại bì nguyên thủy (primitive neuroectodermal tumors –PNET) và u tế bào màng ống nội tủy (ependymomas). Những thử nghiệm này

được thực hiện tại Đại học Columbia, thành phố New York (Hesdoffer và cộng sự., 1994). Các nhà nghiên cứu đã có kế hoạch thu lượm các tế bào tủy xương rồi cho hấp thụ liều cao ThioTEPA, VP-16 và carboplatinium. Một phần ba số tủy xương thu lượm được sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu GTL. Trước tiên các tế bào CD34⁺ được rút ra một cách chọn lọc và được tải nạp với vec tơ retrovirus chuột mã cho gen MDR-1. Sau đó các tế bào tải nạp được trộn với các tế bào tủy xương chưa được tải nạp và rồi truyền lại cho bệnh nhân. Hiệu ứng và độc tính của sự chuyển gen được theo dõi bằng một quy trình chặt chẽ nghiêm ngặt. Nếu bệnh nhân vẫn có thể nhận được taxol thì người ta hy vọng có thể xác định được rằng có sự làm giàu các tế bào gốc của tủy xương tải nạp MDR-1 trên người như đã quan sát thấy trên chuột.

19.4 Tóm lại

Chúng ta phải khiêm tốn thừa nhận rằng, chúng ta mới chỉ ở giai đoạn đầu của công nghệ di truyền. Những kết quả ban đầu từ các nghiên cứu HSV-TK cũng như các cách tiếp cận khác trên người là rất khích lệ. Tuy nhiên, vẫn còn tồn tại một vấn đề là việc phát triển vec tơ và sự chuyển gen. Những tiến bộ đạt được trong các lĩnh vực này sẽ cho phép mở rộng ứng dụng GTL. Nhờ các phát hiện này mà các nhà nghiên cứu đã hiểu cách phối hợp nhiều phương thức khác nhau để tạo được hệ thống chuyển gen hiệu lực tiềm năng mà một nhóm lớn bệnh nhân trước tiên được hưởng là những người bị ung thư. Hy vọng rằng với khoảng thời gian vài năm nữa GTL sẽ trở thành một phương pháp trị liệu tiêu chuẩn cho một số dạng ung thư. Những kết quả thu thập được cho tới hôm nay khẳng định được rằng u não có thể là một trong những bệnh được ứng dụng GTL trước tiên.

Chương XX

ĐIỀU TRỊ VIÊM ĐA KHỚP DẠNG THẤP

20.1 Mở đầu

Viêm đa khớp dạng thấp (rheumatic arthritis – RA) là một bệnh mạn tính, lan tỏa một cách hệ thống, tác động chủ yếu lên các khớp và hình ảnh nổi bật nhất là dẫn tới hủy hoại khớp tiến triển. Vấn đề chính trong điều trị viêm đa khớp dạng thấp (VĐKDT) là không có các tác nhân can thiệp một cách đặc hiệu vào các quá trình chủ chốt của bệnh. Tính phức tạp của bệnh lý học sự hủy hoại hệ thống khớp vẫn chưa hoàn toàn rõ, do đó mà làm giới hạn cho việc tạo ra các phương pháp trị liệu hữu hiệu. Cho tới nay, tiêu điểm của các cách tiếp cận dược lý học là can thiệp vào viêm và đau. Các nỗ lực trong việc phát hiện các thuốc dùng cho VĐKDT vẫn dựa trên kinh nghiệm nhiều hơn là thông qua các thiết kế đặc

hiệu. Tuy nhiên, cho tới nay vẫn chưa có loại thuốc nào cải thiện được đau và ngăn ngừa tốt sự hủy hoại tiến triển của các khớp.

Gần đây đã có nhiều tiến bộ trong việc làm sáng tỏ cơ sở tế bào và phân tử của sự hủy hoại khớp. Những tiến bộ trong sinh học phân tử, việc ứng dụng các mô hình động vật mới cũng như sự chẩn đoán bệnh sớm đã tạo điều kiện hiểu thấu hơn các cơ chế sinh học quan trọng làm sáng tỏ sự hủy hoại của các chất nền ngoại bào trong VĐKDT, dựa trên các số liệu này người ta sẽ đưa ra các chiến lược mới nhằm ức chế sự hủy hoại khớp. Trong số các chiến lược đó thì gen trị liệu (GTL) được quan tâm một cách đặc biệt. Các kỹ thuật của GTL có tiềm năng to lớn để giải quyết một cách đặc hiệu các hành vi “hiếu chiến” của các tế bào gây nên sự hủy hoại khớp.

20.2 Những vấn đề cần xem xét về GTL trong VĐKDT

GTL có thể được định nghĩa như là sự chuyển các gen vào trong các tế bào với mục đích điều trị bệnh. Nguyên bản GTL chỉ được áp dụng cho các bệnh di truyền như xơ nang thông qua việc hiệu chỉnh những bất thường di truyền chủ chốt. Tuy nhiên, các phương pháp chuyển gen cũng đã được sử dụng như một phương tiện chung để chuyển giao nhiều sản phẩm gen, vì thế mà làm tăng phạm vi sử dụng GTL cho các bệnh kể cả các bệnh mắc phải.

Các yếu tố di truyền trong bệnh lý học VĐKDT gần đây đã được chứng minh rằng các đột biến của gen kiểm chế khối u giữ vai trò quan trọng trong. Tuy nhiên, RA không phải gây bởi một đột biến đặc hiệu mà là một bệnh mắc phải, trong đó sự nhạy cảm di truyền không phải là đặc hiệu. Vì vậy trong các cách tiếp cận của GTL với các bệnh như RA thì rõ ràng có sự khác biệt với các bệnh di truyền đã được khẳng định một cách chắc chắn. Ngoài việc làm thế nào để hiệu chỉnh những bất thường về gen đặc hiệu hoặc chuyển một cấu trúc gen xác định thì các vấn đề nhằm điều hòa bệnh lý học mới là khẩn yếu. Vì vậy, quan điểm chung hiện nay là cần phải thiết lập được cách tiếp cận GTL với loại bệnh này. Tuy nhiên, cũng cần phải nhấn mạnh rằng việc sử dụng các phương pháp chuyển gen trong VĐKDT cần lưu ý 2 khía cạnh quan trọng: Thứ nhất là vấn đề dụng cụ phương tiện dùng để nghiên cứu vai trò của các phân tử trong bệnh lý học VĐKDT. Việc sử dụng các phương pháp chuyển gen sẽ giúp làm sáng tỏ các cơ chế bệnh và tạo những bước tiến quan trọng trong việc phát triển các chiến lược điều trị VĐKDT. Thứ hai là, các nỗ lực của các nghiên cứu đương thời đều nhằm mục đích cuối cùng là ứng dụng hữu hiệu phương pháp chuyển gen để điều trị các bệnh VĐKDT ở người. Vì vậy thuật ngữ chuyển gen ở đây muốn hàm ý là GTL đối với VĐKDT.

20.3 Bệnh lý học của VĐKDT

Bệnh lý học VĐKDT bao hàm các hiện tượng tương tác qua lại của viêm mạn tính, thay đổi đáp ứng miễn dịch và tăng sản hoạt dịch. Mặc dầu những số liệu gần đây đã cung cấp những bằng chứng về sự khác biệt trong cơ chế bệnh lý học của viêm và sự hủy hoại khớp xương. Tuy nhiên cũng chưa có câu trả lời khẳng định là cái gì là bước khởi đầu và những ảnh hưởng nào đáng ghi nhớ trong bệnh lý học VĐKDT? Tuy vậy, sự hủy hoại tiến triển sụn và khớp xương là các đại diện độc nhất và nổi bật về đặc trưng của VĐKDT. Người ta có thể phân biệt được VĐKDT với các dạng viêm khác cũng như xác định được hậu quả của nó ở hầu hết các bệnh nhân.

Các tế bào T giữ vai trò chủ chốt trong việc khởi đầu và điều khiển các yếu tố hủy hoại của VĐKDT. Những số liệu gần đây cung cấp nhiều bằng chứng cho thấy các tế bào giống như nguyên bào sợi bên trong màng hoạt dịch của RA giữ vai trò quan trọng.

Điều hấp dẫn là các nguyên bào sợi bao hoạt dịch của VĐKDT (rheumatic arthritis synovial fibroblast –RA-SF) khác rất nhiều nguyên bào sợi bình thường cả về hình thái học lẫn đặc tính của chúng. Đặc trưng của chúng là có hình dạng tròn và to hơn nguyên bào sợi hoạt dịch bình thường, nhân tái nhợt và nổi rõ hạch nhân. Những biến đổi này cùng với một số biến đổi về đặc tính của chúng đã chứng minh rằng những tế bào này là các nguyên bào sợi “biến nạp”. Với việc nghiên cứu các đặc trưng đặc biệt của RA - SF ở mức độ phân tử người ta đã hiểu được rằng sự hoạt hóa tế bào và sự trốn thoát khỏi sự điều hòa bình thường là các sự kiện chính trong việc “biến nạp” của các TB hoạt dịch bình thường thành các TB hoạt dịch VĐKDT. Mặc dầu các tế bào này đã được hoạt hóa nhưng không lộ rõ khả năng làm tăng tốc độ tăng sinh. Sự tăng biểu hiện các gen tiền ung thư và các yếu tố phiên mã càng làm sáng tỏ vai trò quan trọng hơn nữa của sự hoạt hóa tế bào trong nguyên bào sợi hoạt dịch. Những sự kiện này là sự phản chiếu các sự kiện biến nạp xảy ra trong sinh ung thư. Chẳng hạn như một số gen đáp ứng sớm qua trung gian như *c-fos* và *egr-1* tăng biểu hiện trong các nguyên bào sợi hoạt dịch VĐKDT và mức độ biểu hiện của nó có liên quan tới sự biểu hiện collagenase trong những tế bào này. Nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy sự phiên mã cao các gen tiền ung thư như *c-jun* và *c-myc* ở RA-SF; *c-fos* và *c-jun* có liên quan tới việc hình thành yếu tố phiên mã AP-1, yếu tố này đáp ứng cho việc điều hòa một số enzyme phân giải chất nền. Hoạt tính liên kết DNA cao của AP-1 đã được chứng minh ở RA-SF. Một số dữ kiện đã chứng minh rằng tăng biểu hiện AP-1 có liên quan đến phân tử trung gian jun và fos thông qua sự hoạt động của các gen ung thư như ras, src và raf. Gen ung thư raf cảm ứng kéo dài hoạt tính của các phân tử có liên quan tới con đường hoạt hóa phân bào của protein kinase (mitogen activated protein kinase –[MAPK] pathway). Sau cùng, người ta tập trung vào việc nghiên cứu các tín hiệu nội bào thông qua con đường MAPK. Tuy nhiên, cơ chế chuẩn xác và các con đường trung gian hoạt hóa tế bào của RA-SF vẫn chỉ được biết đến phần nào. Điều thú vị là những công trình gần đây đã chỉ rõ rằng jun D chống lại c-jun bởi hiệu ứng đối nghịch trong sự tăng sinh tế bào của nguyên bào sợi cũng như cytokine và các sản phẩm metalloproteinase chất nền (matrix metalloproteinase [MMP] production). Vì thế, người ta đã chứng minh được rằng sự khiếm khuyết hoặc biểu hiện không cân bằng của jun D có thể góp phần vào việc hoạt hóa RA-SF.

Cũng có bằng chứng cho thấy các cách chết theo chương trình (apoptosis) cũng liên quan tới hoạt dịch VĐKDT. Apoptosis có thể làm thay đổi lớp hoạt dịch qua trung gian là sự hủy hoại tiến triển sụn và xương. Dưới 1% số tế bào biểu hiện đặc trưng hình thái của apoptosis (xác định bằng phương pháp siêu cấu trúc). Một vài công trình nghiên cứu cho biết có sự biểu hiện của các phân tử kháng apoptosis như bel-2 và sentrin trong các tế bào hoạt dịch. Mặc dầu còn có một số vấn đề chưa thể trả lời được liên quan tới sự điều hòa apoptosis trong VĐKDT, nhưng rõ ràng là các tín hiệu kiểm chế apoptosis có nhiều tác dụng hơn là tín hiệu tiền apoptosis và kháng apoptosis. Sự mất cân bằng này có thể dẫn tới sự nới rộng thời gian sống của các tế bào dòng hoạt dịch cũng như kéo dài sự biểu hiện của các enzyme phân giải chất nền ở các vị trí khớp bị hủy hoại.

Hoạt hóa các tế bào hoạt dịch cũng là một nguyên do chính để gắn RA-SF vào sụn và xương. Quá trình này là nòng cốt của VĐKDT khi so sánh với các loại viêm khớp không gây hủy hoại khác, quá trình này thông qua trung gian nhiều protein bề mặt khác như

integrin, VCAM-1 và CD44. Sự hoạt hóa các tế bào hoạt dịch sẽ điều hòa lên các phân tử kết dính này. Nhưng sự biểu hiện các gen chu kỳ tế bào sớm như *c-fos* và *c-myc* lại được kích thích xa hơn bởi các phân tử kết dính tế bào. Hơn nữa, sự biểu hiện của các phân tử kết dính như VCAM-1 bởi RA-SF lại góp phần làm suy yếu tế bào T và cảm ứng sự tạo mạch. Vì thế vai trò của các phân tử kết dính trong VĐKDT không bị giới hạn bởi việc gắn hoạt dịch với sụn và xương, nhưng nó lại liên quan tới sự tuyển mộ các tế bào viêm cũng như cảm ứng MMP.

Sự hủy hoại xương và sụn khớp do RA-SF bị biến dạng qua trung gian có sự phối hợp tác động của các enzyme phân giải chất nền khác. Trong số đó thì MMP giữ vai trò quan trọng hơn cả. MMP-1 và MMP-3 tăng trong hoạt dịch của các bệnh nhân VĐKDT khi so sánh với OA và nó được giải phóng với một số lượng lớn bởi các tế bào giống như nguyên bào sợi của hoạt dịch trong nuôi cấy mô.

Các nghiên cứu *in situ* đã chứng minh có biểu hiện nhiều MMP-1, MMP-3, MMP-13 và cả mRNA cũng như protein trong các hoạt dịch khớp. Các số liệu gần đây cho thấy các MMP dạng màng (membrane type [TM] MMP) cũng biểu hiện nhiều trong những tế bào xương và sụn đang bị phá hủy mạnh. Điều này quan trọng đặc biệt bởi vì các thành viên họ MMP này như MT-MMP chẳng những phân giải các thành phần chất nền ngoại bào mà còn hoạt hóa các MMP khác như MMP-2 và MMP-13. Cũng rõ ràng rằng một số tiền gen ung thư cũng có liên quan trực tiếp trong việc điều hòa lên của các MMP khác trong tiến trình của bệnh.

Để nghiên cứu các đặc tính phân tử của RA-SF với sự vắng mặt các tế bào khác của người cũng như sự góp phần của chúng vào sự hủy hoại sụn, người ta đã phát triển mô hình đồng cấy ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng (SCID). Trong mô hình này các RA-SF cô lập được đồng cấy ghép với sụn tươi của người bình thường vào dưới nang thận của chuột SCID và giữ 60 ngày. Sau khi giết chuột, các mô cấy được lấy ra và sự xâm lấn của RA-SF vào trong sụn được phân tích bằng cách nhuộm màu H&E thông thường cũng như lại *in situ* và hóa miễn dịch. Nhờ mô hình này mà đã chỉ rõ rằng RA-SF vẫn duy trì kiểu hình của chúng và có đặc tính “xâm lấn”. Trái ngược với OA hoặc nguyên bào sợi hoạt dịch bình thường, RA-SF hủy hoại sụn tiến triển ngay cả khi vắng mặt các tế bào viêm của người.

Mặc dầu các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng dường như ít có liên quan giữa viêm và sự hủy hoại khớp, nhưng cần phải nhấn mạnh rằng các tế bào T và đại thực bào có thể điều chỉnh đặc tính của RA-SF thông qua việc sản xuất các cytokine. Trong ngữ cảnh này thì interleukin-1 (IL-1) và yếu tố hoại tử khối u α (tumor necrosis factor- α [TNF- α]) được quan tâm đặc biệt bởi vì chúng kích thích cả viêm và hủy hoại khớp trong VĐKDT. IL-1 và TNF- α được sản xuất chủ yếu bởi các dòng tế bào giống như đại thực bào và có khả năng cảm ứng nhiều cytokine, chemokine khác và prostaglandin. Hơn nữa ngay cả cytokine cũng có thể kích thích trực tiếp việc sản xuất các enzyme phân giải chất nền như các MMP. Vì thế, sự tương tác của các tế bào giống đại thực bào, nguyên bào sợi cũng như các tế bào sụn kế cạnh cũng góp phần làm sưng màng khớp mạn tính. Các số liệu nghiên cứu trên động vật cũng như các kết quả thu được từ các nghiên cứu lâm sàng khi sử dụng các IL-1 và các chất ức chế TNF- α đã làm nổi bật tầm quan trọng của 2 cytokine này trong tiến trình của bệnh. Tuy nhiên, cũng có bằng chứng phản ánh tầm quan trọng của TNF- α và IL-1 trên phương diện gây viêm và hủy hoại khớp. Trong khi TNF- α là đáp ứng sơ cấp làm lan tỏa sưng màng khớp thì IL-1 dường như lại có tác động lớn hơn trong việc hủy hoại sụn.

20.4 Chuyển gen tới các tế bào hoạt dịch

Việc chuyển gen vào trong các tế bào đích như RA-SF có thể đạt được bằng nhiều phương pháp. Các virus có khả năng một cách tự nhiên trong việc chuyển các gen của chúng vào các tế bào vật chủ và vì vậy các vec tơ virus cũng được sử dụng để chuyển gen trong VDKDT. Tuy nhiên, việc sử dụng các vec tơ virus cho chuyển gen đòi hỏi phải có những cải biến thật sự ở hệ gen gốc của virus. Ngoài yêu cầu chuyển được các gen mong muốn, những sửa đổi cũng được đặt ra với việc cải biến những sao chép vô hiệu quả của các hạt virus trong các tế bào thâm nhiễm. Các hạt vec tơ thích hợp sẽ tạo nên sự an toàn tối đa, hiệu ứng tải nạp cao và biểu hiện dài hạn các gen chuyển. Nói chung, các retrovirus, adenovirus và virus adeno liên hợp (AAV) đều được sử dụng cho mục đích này. Cho tới nay, các vec tơ retrovirus đã được sử dụng rộng rãi cho việc chuyển gen RA-SF bởi vì chắc chắn chúng biểu hiện dài hạn các gen chuyển. Đối với VDKDT thì virus gây bệnh bạch cầu của chuột Moloney (Moloney murine mouse leukomia virus [Mo-MuLV]) đã được thiết kế lại thành virus khiếm khuyết sao chép và được sử dụng như một vec tơ để tải nạp các tế bào nguyên bào sợi. Trong vec tơ này thì các thành phần như vec tơ MFG, gen *env* (cần thiết vì virus phải tổng hợp các protein vỏ của chúng) đã được thay thế bằng các gen chọn lọc. Khi thâm chuyển các tế bào đóng gói sản xuất vỏ virus thì sẽ tạo nên các hạt virus khiếm khuyết sao chép. Những virus này có thể được dùng để tải nạp RA-SF. Các vec tơ LXS retrovirus cũng đã được sử dụng. Ngoài promoter LTR điều khiển sự biểu hiện gen ra thì các promoter SV40 cũng được sử dụng để biểu hiện gen kháng neomycin (r). Những cấu trúc như vậy sẽ cho phép chọn lọc được các RA-SF đã tải nạp nhờ sử dụng kháng sinh G418. Tuy nhiên, việc sử dụng các vec tơ retrovirus như MFG hay các vec tơ khác lại có những giới hạn đáng kể. Vì các hạt retrovirus không có khả năng thâm nhiễm các tế bào không phân chia nên trong các cách tiếp cận *ex vivo* nó được sử dụng theo cách ủ các RA-SF nuôi cấy với các hạt virus khiếm khuyết sao chép và tiếp theo là lọc ra các tế bào được tải nạp thì sẽ kéo dài được sự biểu hiện của gen chuyển. Hiện nay người ta đang nỗ lực tạo ra các vec tơ retrovirus cho các cách tiếp cận *in vivo*. Điều này sẽ tránh được nhiều can thiệp phẫu thuật (đó là những bất lợi lớn của *ex vivo*). Tuy nhiên, có một yếu tố giới hạn khác là không thể đoán trước được vị trí để cài vào trong hệ gen vật chủ và như thế thì thế nào cũng có các rủi ro tiềm ẩn về các gen đột biến ghép.

20.5 Các mô hình động vật dùng để test gen trị liệu

Mô hình thích hợp cho GTL VDKDT không chỉ phản ánh những đặc trưng thích đáng của bệnh mà còn cho phép phân tích những biến đổi của các quá trình chủ chốt của bệnh sao cho gần với các điều kiện trên người. Khi tiêm nhiều kháng nguyên thì sẽ gây cảm ứng tái viêm làm hư khớp. Các mô hình như viêm khớp cảm ứng collagenase (collagenase-induced arthritis -CIA) và viêm khớp cảm ứng kháng nguyên thành tế bào streptococcus (streptococcal-wall antigen induced arthritis -SCW-A) đã được dự kiến và các mô hình VDKDT của người đã được nghiên cứu rất khẩn trương. Những mô hình này đã cung cấp những kiến thức quan trọng về các cơ chế phân tử của viêm khớp và làm sáng tỏ các khía cạnh chính của sự hủy hoại khớp. Vì thế mà các mô hình này đã được sử dụng để nghiên cứu hiệu ứng của sự chuyển gen. Tuy nhiên, trong tất cả các động vật này đều thấy viêm

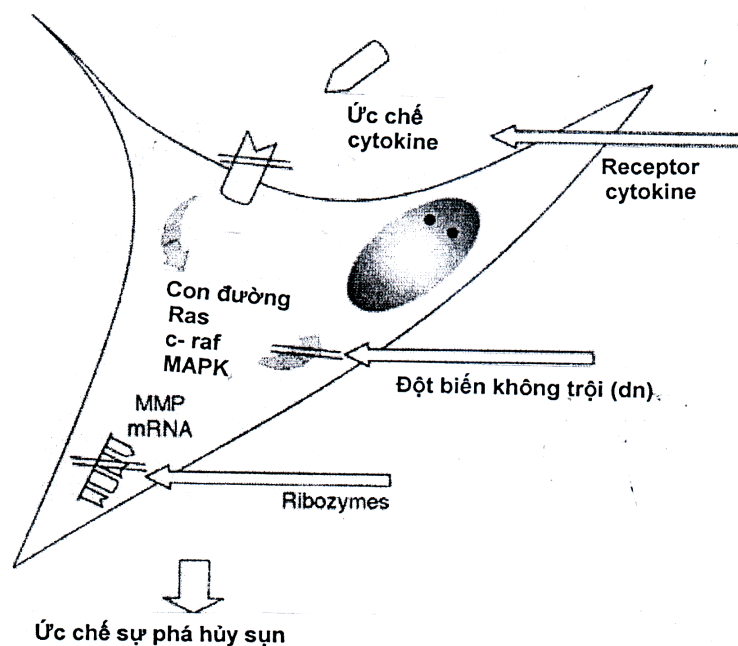
khớp là hậu quả của các kháng nguyên vì thế mà chúng bị giới hạn rất lớn khi được sử dụng để nghiên cứu hiệu ứng tiềm ẩn của GTL với VĐKDT trên người. Do hệ quả này nên mô hình đồng cấy ghép trên chuột SCID về hiệu ứng chuyển gen đối với RA-SF hiện nay hay được sử dụng nhất. Trong mô hình này, đặc tính của các tế bào RA-SF đã biến đổi gen sẽ được khảo sát bằng cách dùng chuột như một “bình nuôi cấy sống” (living culture flask). RA-SF nuôi cấy được ghép cùng với sụn tươi người bình thường vì thế mà có thể áp dụng cách tiếp cận này để chuyển gen retrovirus cũng như adenovirus. Tuy nhiên, cũng cần phải giữ một số RA-SF tải nạp bằng cách nuôi cấy trong suốt thời kỳ cấy ghép để phân tích sự biểu hiện gen của những tế bào này cũng như những biến đổi của các tín hiệu nội bào.

20.6 Những đích hiện nay của GTL viêm đa khớp dạng thấp

Trên cơ sở các số liệu đã nêu trên mà một số cách tiếp cận về sự chuyển gen vào các RA-SF đã được phát triển. Có 3 chiến lược chính (Hình 61) bao gồm:

1. Can thiệp bằng cách kích thích RA-SF với các cytokine và các yếu tố tăng trưởng.
2. Điều biến tín hiệu và các phân tử điều hòa apoptosis.
3. Ức chế trực tiếp các enzyme phân giải chất nền như MMP và các cathepsin.

Như đã chỉ rõ, việc ức chế các cytokine gây viêm như IL-1 và TNF- α là cách tiếp cận lý thú nhằm làm giảm sự hủy hoại sụn và gây viêm. Thật may là có một chất ức chế tự nhiên IL-1- đó là kháng chủ vận receptor IL-1 (IL-1 receptor antagonist [IL-1 Ra]). Trong màng hoạt dịch bình thường thì IL-1Ra chủ yếu được sản xuất bởi nguyên bào sợi và đại thực bào. Do liên kết cạnh tranh với receptor IL-1 nên IL-1 Ra làm mất tác dụng hiệu ứng của IL-1 và tạo điều kiện cho sự cân bằng nội mô trong màng hoạt dịch. Vì có sự biểu hiện vượt mức IL-1 trong màng hoạt dịch VĐKDT nên việc tăng IL-1 Ra có thể là cách tiếp cận khả thi để làm giảm hiệu ứng tiền viêm của IL-1. Tuy nhiên, để đạt được mục đích thì phải có một lượng dư lớn các phân tử IL-1 Ra. Sở dĩ như vậy vì ái lực của IL-1 Ra không vượt hơn hẳn IL-1 và IL-1 lại còn có một hiệu ứng dự trữ nữa (spare receptor effect). Một vài nghiên cứu đã khảo sát sự biểu hiện quá mức của IL-1Ra trong các tế bào hoạt dịch. Cấu trúc MFG-IRAP đã được sử dụng để can thiệp vào viêm khớp cảm ứng kháng nguyên ở thỏ *in vivo* và *ex vivo*. Trong một nghiên cứu khác thì hiệu ứng chuyển gen với IL-1 Ra lại được xác định bằng việc phát triển viêm khớp với thành tế bào vi khuẩn ở chuột Lewis và một cấu trúc có cơ sở LXS. Những nghiên cứu này đã thể hiện rõ hiệu ứng kháng viêm mạnh của sự chuyển gen IL-1Ra.



Hình 20.1 Các chiến lược chuyển gen để ức chế sự hủy hoại sụn qua trung gian nguyên bào sợi hoạt dịch VĐKDT (RA-SF). Những cách tiếp cận hiện thời liên quan tới (a) ức chế sự kích thích bên ngoài của RA-SF bằng cách ngăn chặn sự hoạt động của các cytokine tiền viêm thông qua sự biểu hiện quá mức receptor cytokine/kháng chủ vận, (b) ngăn chặn thác tín hiệu bên trong như con đường Ras-c-Raf-MAPK nhờ việc sử dụng các thể đột biến không trội của các phân tử tín hiệu và (c) phân cắt mRNA của enzyme phân giải chất nền thông qua sự chuyển giao ribozyme vào RA-SF. (Theo Renate E. Gay, Steffen Gays và Thomas Pap. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2001)

Hơn nữa, các công trình trước cũng đã cho thấy có hiệu ứng tăng tổng hợp proteoglycan. Tuy nhiên, trong các nghiên cứu ở mô hình chuột SCID khi sử dụng RA-SF và sụn tươi của người lại thấy không có biến đổi nào về đặc tính xâm lấn của RA-SF vào trong sụn. Trong các nghiên cứu ở chuột SCID, khi tải nạp RA-SF với MFG-IRAP lại không dẫn tới sự khác biệt đáng kể nào về mức độ xâm lấn nếu so với các tế bào được tải nạp với Lac Z và các tế bào tải nạp giả. Tuy nhiên, về khía cạnh thoái hóa màng sụn thì có hiệu ứng rõ ràng. Trong khi các nguyên bào sợi VĐKDT thâm nhiễm với Lac Z và thâm nhiễm giả vẫn làm sự hủy hoại màng sụn đáng kể thì người ta lại thấy sự thoái hóa quanh tế bào giảm đáng kể trong RA-SF được thâm nhiễm với IL-1 Ra. Vì thế việc bảo trì tính hợp nhất chất nền của các tế bào sụn là thành quả chính của sự chuyển gen IL-1Ra vào trong Ra-SF người. Những số liệu này chỉ rõ rằng sự hủy hoại sụn của các tế bào sụn là một quá trình được điều khiển bởi IL-1. Hơn nữa, có thể kết luận được rằng con đường độc lập IL-1 cũng góp phần đáng kể vào sự kết dính của nguyên bào sợi VĐKDT với sụn và sự hủy hoại kế tục của nó.

TNF- α là một cytokine gây tiền viêm có thể là đích của GTL với VĐKDT. Cũng tương tự như IL-1, cũng còn một chất ức chế tự nhiên với TNF- α làm “rơi rụng” các receptor hòa

tan. Và trong VĐKDT có sự mất cân bằng giữa biểu hiện chất ức chế tự nhiên của TNF- α và TNF- α trong màng hoạt dịch khớp. Sự mất cân bằng này có thể là nguyên nhân chính của sự điều hòa ngược các con đường viêm nhiễm qua trung gian TNF- α . Vì thế mà việc làm tăng lượng protein receptor TNF- α , chẳng hạn như dạng p55 của chúng (TNFRp55) là con đường đầy hứa hẹn làm giảm viêm và sự hủy hoại khớp. Cách tiếp cận này được hưởng ứng bởi các nghiên cứu lâm sàng đã chứng minh rằng sự phong tỏa TNF- α là an toàn và có hiệu quả. Trong các thử nghiệm lâm sàng gần đây người ta đã sử dụng các protein hòa nhập (fused protein) của TNFRp55 cũng như TNFRp75. Tuy nhiên, việc tải nạp nguyên bào sợi hoạt dịch VĐKDT với TNFRp55 trong các mô hình chuột SCID lại không làm giảm sự hủy hoại sụn. Chỉ có vài mô cấy ghép là thể hiện có làm giảm nhẹ tính xâm lấn bởi các nguyên bào sợi hoạt dịch, nhưng cũng chưa đạt tới ý nghĩa thống kê. Những số liệu này đã ủng hộ cho giả thuyết về sự ức chế của TNF- α và khi giảm đáng kể viêm hoạt dịch thì sẽ làm giới hạn hiệu ứng hủy hoại khớp.

Interleukine 10 (IL-10) là một cytokine kháng viêm, điều hòa xuống IL-1, TNF- α , IL-2, IL-6 và β -interferon nên nó được sử dụng để ức chế viêm và phân giải chất nền. Trong màng hoạt dịch khớp IL-10 được sản xuất nhiều bởi đại thực bào và các tế bào T. Mặc dầu nó có hiệu ứng kháng viêm, nhưng IL-10 lại có nhiều trong hoạt dịch và huyết thanh VĐKDT. Vì thế, có thể suy đoán được rằng sự gia tăng này phản ánh đáp ứng ức chế chưa đủ của hệ miễn dịch khi đã được hoạt hóa trong màng hoạt dịch. Vì IL-10 cũng ức chế sự hoạt động của tyrosine kinase và tín hiệu *Ras* điều hòa lên cathepsin L, IL-10 nên nó là ứng cử viên hứa hẹn cho việc chuyển gen trong VĐKDT. Trị liệu gen với cơ sở IL-10 rõ ràng là có lợi cho cả viêm và sự hủy hoại khớp. Các nghiên cứu về gen IL-10 trên chuột CIA đã chứng minh có hiệu ứng dương đối với sự tấn công viêm, kiểm chế tính nghiêm trọng của bệnh cũng như sự hủy hoại khớp. Các nghiên cứu về chuyển gen IL-10 ở mô hình chuột SCID cho thấy đã làm giảm sự xâm lấn tới mức thấp nhất trong số các thực nghiệm đã được tiến hành. Tuy nhiên, tải nạp IL-10 lại không làm giảm sự hủy hoại sụn. Vì thế có thể kết luận được rằng khi đồng tải nạp IL-1 và IL-10 là cách hợp nhất lý thú các lợi thế của sự chuyển gen IL-10 và IL-1Ra. Hiện nay, các nghiên cứu đang khảo sát về tính khả thi của các cách tiếp cận này cũng như việc chuyển giao các gen cytokine khác.

Tuy việc nghiên cứu các con đường và các tầng (thác) tín hiệu chính xác làm hoạt hóa RA-SF cũng chỉ mới bắt đầu và chỉ có vài con đường cho các tư liệu tốt. Nhưng nó cũng chỉ rõ rằng các tín hiệu ngoại bào được chuyển đi bởi thác *Ras-Raf*-MAPK tới nhân và một số tiền gen ung thư xác định. Vì thế khi ngăn chặn con đường *Ras-Raf* của MAPK thì có thể làm giảm việc sản xuất MMP và các cathepsin (Hình 6.1). Cơ chế ngăn chặn các con đường tín hiệu là việc sử dụng các thể đột biến không trội các phân tử tín hiệu như *c-Raf*. Các thể đột biến không trội (dominant negative -dn) là đại diện của các biến thể đột biến các phân tử không có chức năng này. Chúng được kiến tạo bằng cách loại bỏ các phần gen quan trọng cho sự hoạt động của chúng và có thể được sử dụng để nghiên cứu hiệu ứng của các phân tử tín hiệu về đặc tính xâm lấn của RA-SF. Các thể đột biến không trội của *c-raf* cũng được sử dụng để khảo sát hiệu ứng về tính “hiếu chiến” của các phân tử RA-SF. Trong những thí nghiệm này, một cấu trúc với cơ sở LXS retrovirus đã được sử dụng để chuyển các gen của thể đột biến dn-*c-raf* tới RA-SF.

Khi tải nạp RA-SF với gen đột biến dn-*c-raf* đã cho thấy không có biến đổi đáng kể trong sự tăng trưởng hay apoptosis ở các tế bào đích. Khi dùng các RA-SF tải nạp trong mô hình chuột SCID quan sát thấy có giảm đặc tính xâm lấn. Tuy nhiên, con đường độc lập Raf cũng góp phần vào việc hoạt hóa các nguyên bào sợi trong VĐKDT. Dựa trên các số liệu

đã thu thập được về sự biểu hiện *jun D* trong VĐKDT thì sự chuyển gen với *jun D* có thể có hiệu ứng tiềm tàng trong VĐKDT.

Các cách tiếp cận khác hiện nay lại can thiệp trực tiếp các chất hoạt hóa phiên mã như NF κ B. NF κ B biểu hiện ở mọi nơi và nó liên quan tới việc điều hòa rất nhiều gen, trong số đó có các gen có khả năng đáp ứng viêm trong VĐKDT. Quá trình này được điều hòa bởi chất ức chế tương bào của nó là I κ B α . Sự hoạt hóa NF κ B bởi các phân tử như TNF- α có liên quan tới sự phân giải nhanh I κ B α . Các mẫu thiết kế (mô tif) gắn NF κ B chẳng những đã được mô tả trong các promoter của một số gen MMP mà ngay cả các dẫn liệu gần đây đã chứng minh rằng nếu ức chế NF κ B thì sẽ làm giảm sự tổng hợp chất hoạt hóa dạng plasmin của urokinase (urokinase-type plasmin activator [u PA]). Chất này cũng có liên quan tới sự hoạt hóa một số MMP. Trên cơ sở những dẫn liệu này, một số chiến lược đã được phát triển nhằm can thiệp vào sự hoạt hóa NF κ B trong RA-SF. Nhờ việc sử dụng cấu trúc retrovirus biểu hiện quá mức I κ B α trong một số dạng tế bào mà tính khả thi của cách tiếp cận này trong việc ngăn ngừa sự phân giải cảm ứng IL-1 của I κ B α cũng như sự hoạt hóa NF κ B đã được kiểm chứng (test). Hiệu ứng tải nạp RA-SF với một cấu trúc liên quan tới đặc tính hiệu chiến của các tế bào này hiện đang được khảo sát, nhưng một số bằng chứng đã chỉ rõ vai trò trung tâm trong sự hoạt hóa tế bào là NF κ B. Hơn nữa, những số liệu gần đây cũng cho thấy các phân tử kháng apoptosis bel-2 có liên quan tới sự hoạt hóa NF κ B thông qua sự phân giải I κ B α . Những số liệu này đã vạch rõ mối liên kết giữa Bel-2 và con đường tín hiệu NF κ B trong việc điều hòa apoptosis. Vì những biến đổi ở con đường này dẫn đến apoptosis nên nó đã tạo điều kiện cho việc xuất hiện kiểu hình hiệu chiến của RA-SF, đó là các nỗ lực được tạo ra để can thiệp vào các phân tử điều hòa apoptosis trong VĐKDT. Phân tử kháng apoptosis mới được mô tả gần đây (sentrin) là một gen ứng cử viên điều hòa lên RA-SF (khi so sánh với hoạt dịch OA và hoạt dịch bình thường). Vì thế việc sử dụng các cấu trúc antisense mRNA kháng sentrin để ức chế sự biểu hiện của sentrin hiện nay đang được khảo sát.

Sau chót là việc điều hòa pha cuối cùng của MMP và điều hòa lên cathepsin bằng cách cắt bỏ hoặc ngăn chặn (khóa) mRNA của enzyme này là đích chính của sự chuyển gen trong VĐKDT (Hình 6.1). Vấn đề này có thể được thực hiện bằng cách chuyển các cấu trúc antisense mRNA đặc hiệu MMP hoặc các ribozyme hammerhead (đã được đề cập ở trên). Những ribozyme này có thể được sử dụng để hủy các thông tin đặc hiệu bên trong tế bào. Các nguyên bào sợi hoạt dịch VĐKDT biểu hiện các ribozyme có khả năng phân cắt collagenase do đó ức chế việc sản xuất enzyme hay làm giới hạn mức enzyme *in situ*.

20.7 Hiện trạng lâm sàng và triển vọng của viêm đa khớp dạng thấp

Các thử nghiệm lâm sàng bước đầu hướng vào độ an toàn và tính khả thi của sự chuyển gen tới màng hoạt dịch người đã được thực hiện từ 5 năm trước đây. Trong thực nghiệm lâm sàng pha I này, một vec tơ MFG retrovirus mang cDNA của gen IL-1Ra người (MFG-IRAP construct) đã được sử dụng. Tổng cộng có 9 bệnh nhân cần thay thế toàn bộ khớp MCP vì VĐKDT nghiêm trọng đã được tham gia nghiên cứu. Trước hết RA-SF được rút ra khỏi các khớp MCP và được tải nạp với cấu trúc MFG-IRAP *ex vivo*. Các tế bào đã được tải nạp sau đó được tiêm trở lại vào các khớp. Một tuần sau, các khớp MCP được rút ra và thực hiện việc phẫu thuật thay thế toàn bộ khớp. Tất cả các bước đều được thực hiện trong những điều kiện an toàn gần như tuyệt đối bao hàm cả việc rào chắn các retrovirus biết sao chép. Những kết quả bước đầu của các nghiên cứu này chỉ rõ có thể chuyển gen

tới các khớp của người một cách an toàn và hiệu quả. Việc khảo sát chót các khớp cần phải loại bỏ sẽ được thực hiện với các kỹ thuật tổ chức học thông thường cũng như lại *in situ* và hóa miễn dịch.

Về vấn đề GTL với VĐKDT chúng ta cần phải khảo sát những con đường đặc hiệu gây bệnh cũng như thiết kế và ứng dụng các vec tơ virus mới có thể hợp nhất đặc hiệu vị trí vào trong hệ gen vật chủ với độ an toàn tuyệt đối đồng thời kéo dài thời gian biểu hiện của gen.

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC I

MỘT SỐ KHÓA CẠNH SINH HỌC VIRUS LIÊN QUAN TỚI SỰ CHUYỂN GEN

1.1 Hệ gen của virus

Hệ gen (genome) của virus gồm cả RNA và DNA, nhưng mỗi virus chỉ chứa hoặc RNA hay DNA. Hệ gen (acid nucleic) được bao bởi vỏ protein (capsid) thì gọi là *virion*, nếu thiếu một trong 2 thành phần trên thì gọi là viroid.

Hệ gen DNA có thể là các sợi đơn hoặc kép, cũng có thể là các phân tử đóng vòng hay duỗi thẳng. Cũng có một số dạng bất thường như DNA sợi kép, thẳng nhưng lại có các khía ở các điểm khác nhau trên chuỗi hoặc DNA sợi kép nhưng lại đóng lại ở phần đuôi. Kích thước của virus DNA vào khoảng $1,2 \times 10^6 - 2 \times 10^8$ dalton, tương ứng với 3000 - 375.000 base. Các virus RNA thì đơn giản hơn vì hệ gen thẳng bao gồm các phân tử đơn hoặc kép và cũng có thể chỉ có 1 hay một vài phân tử trong một hệ gen. Những biến đổi chính trong hệ gen RNA kép - đơn là phân tử này có thể hoạt động như một mRNA và cũng có thể là thành phần hỗ trợ cho các mRNA virus. Kích thước của hệ gen RNA nhỏ hơn rất nhiều hệ gen DNA, nó chỉ vào khoảng $1,2 \times 10^6 - 7 \times 10^6$ dalton, tức vào khoảng 300-30.000 base.

Virus không có quá trình trao đổi chất độc lập, chúng phải sử dụng bộ máy của vật chủ để tổng hợp các thành phần của chúng. Virus có một số enzyme có chức năng kiểm soát di truyền tạo nên các vật liệu sống, hệ gen virus, chúng được sản sinh trong quá trình thâm nhiễm vào tế bào vật chủ. Trong quá trình thâm nhiễm vào tế bào vật chủ, hệ gen virus thoát khỏi vỏ protein và chui vào trong tế bào.

Quá trình sao chép của mRNA xảy ra trong nhân tế bào vật chủ và sử dụng enzyme RNA polymerase phụ thuộc DNA của tế bào vật chủ. Riêng poxvirus lại có RNA polymerase phụ thuộc DNA của chính nó và không bao giờ đi vào nhân tế bào.

mRNA được tổng hợp trước khi vào bào tương của tế bào vật chủ để sao chép. Quá trình này cho phép một số virus tạo ra các protein phức tạp từ một sợi RNA qua việc nối xen kẽ và thay đổi vị trí của các bộ ba. Có 2 loại mRNA:

***mRNA sớm:** Mã cho các protein cần cho sự nhân lên của DNA, các protein cần cho sự biểu hiện gen.

Các virus DNA gây ung thư có các mRNA sớm trong các tế bào được chuyển dạng và không bao giờ có mRNA muộn.

***mRNA muộn:** Mã cho các protein cấu trúc như capsid và protein màng. Vì DNA của virus đã được nhân lên nên mRNA muộn thường được sao chép lại từ DNA mới.

Quá trình dịch mã thành protein xảy ra ở bào tương, virus sử dụng ribosome của tế bào vật chủ.

Quá trình tổng hợp DNA xảy ra trong nhân, ngoại trừ poxvirus. Quá trình này nhờ DNA polymerase phụ thuộc DNA của virus (một protein của mRNA sớm).

Quá trình lắp ráp capsid của virus có thể xảy ra trong nhân hoặc bào tương. Quá trình này là tự phát nên không cần enzyme cũng như năng lượng.

Các virus có lớp vỏ bọc nhờ mọc chồi qua màng tế bào (Hepad và Pox), qua màng nhân (Herpes). Quá trình này thường không phá hủy tế bào. Các virus không có vỏ bọc thường được giải phóng bằng cách ly giải tế bào (giết chết tế bào vật chủ) hoặc được đẩy ra khỏi tế bào vật chủ (không giết chết tế bào).

1.2 Virus chỉ thâm nhiễm các tế bào xác định

Như chúng ta đều biết dường như các virus khác nhau sẽ thâm nhiễm các quần thể khác nhau của tế bào. Đây là vấn đề được đặc biệt quan tâm khi thiết kế vec tơ cũng như thâm nhiễm các tế bào đích. Người ta thấy rằng virus bệnh sởi có liên quan tới các tế bào của da, trong khi đó virus bệnh quai bị lại chỉ thâm nhiễm các tế bào của tuyến nước bọt. Nhưng cũng thật khó hiểu là, một cách tình cờ người ta đã quan sát thấy virus sởi và quai bị đều là thành viên của cùng một nhóm (paramyxovirus) và đều vào trong cơ thể bằng cùng một con đường (thâm nhiễm khởi đầu ở biểu mô đường hô hấp). Vậy tại sao sau đó chúng lại thâm nhiễm các mô đích, các tế bào khác nhau để tạo nên các bệnh đặc trưng?

Một bức tranh tương tự nổi lên là thang vật chủ (host range), hay là các dạng tế bào hoặc cơ quan mà một virus đặc biệt có thể thâm nhiễm được. Nấc thang này có thể rộng tới mức vượt qua ranh giới ngành (nhiều togavirus có thể thâm nhiễm được cả các tế bào côn trùng cũng như các tế bào của động vật có vú) hoặc chỉ giới hạn tới các tế bào của lớp phân loại đơn (poliovirus chỉ thâm nhiễm các tế bào động vật có vú). Cũng có thang vật chủ khác lại rất hẹp, chỉ gồm những nòi nhất định của một loài đơn hay một dạng tế bào xác định trong một tổ chức đặc biệt. Chẳng hạn như bacteriophage (thực khuẩn thể) T4 thì chỉ thâm nhiễm một vài nòi của loài đơn *E.coli*, trong khi đó HIV lại thâm nhiễm các tế bào lympho T giúp đỡ sơ cấp hoặc các tế bào trình diện kháng nguyên giống như đại thực bào hay các tế bào sợi nhánh của người. Một ví dụ điển hình là một số bacteriophage RNA chỉ thâm nhiễm những nòi nhất định của vi khuẩn cùng loài và những vi khuẩn này phải biểu hiện một gen đặc biệt có mang một plasmid dạng đơn.

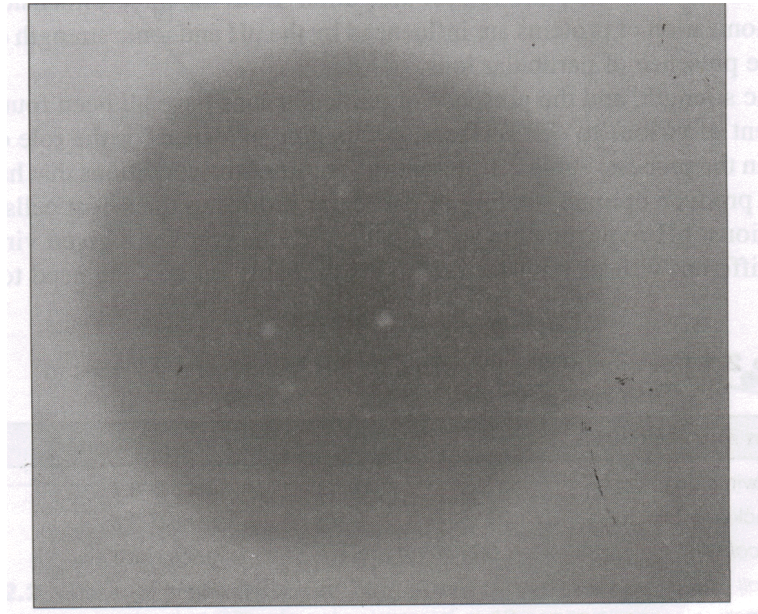
Chúng ta lại có thể đặt câu hỏi cái gì có thể đáp ứng cho tính đặc hiệu đặc trưng cho sự tương tác virus và tế bào vật chủ? Tính đặc hiệu của một virus với tế bào vật chủ của nó có thể là kết quả của các sự kiện ở 2 giai đoạn khác nhau của chu kỳ sao chép: gắn virion vào bề mặt tế bào vật chủ hoặc biểu hiện hệ gen virus trong tế bào vật chủ. Về các vấn đề này thì việc gắn vào bề mặt tế bào có vẻ vì lý do tiến hóa rất kinh tế. Nếu một virus chủ đích tấn công vào một tế bào không thích ứng thì chắc chắn khó có thể xảy ra (và vì thế mà không thể vào được bên trong tế bào) thì virus này có thể thử lại trên một tế bào khác. Nếu virus đã thực sự chui vào được vào một tế bào mà lại không có khả năng trợ giúp sao chép cho nó thì thật ra chẳng đạt được mục đích gì. Virus này thật sự là bất hoạt bởi vì nó không thể sản sinh ra các virus con cháu và cũng không thể rời tế bào này để lại chui vào một vật chủ tiềm tàng mới. Có thể ví áp lực tiến hóa dẫn tới tính đặc hiệu như một hiện tượng tương tác virus/bề mặt tế bào vật chủ.

Có một số dẫn liệu thực nghiệm soi sáng cho giả thuyết này. Trước hết, một cách rõ ràng là tất cả các tế bào trong cơ thể đều nằm trong một vương quốc đặc biệt, có khả năng thực hiện các hoạt động trao đổi chất (chuyển hóa) trên các mô hình tương tự như mô hình ở Central Dogma of molecular Biology. Nếu một virus tự nó có thể sản xuất được trong một dạng tế bào nào đó – tế bào gan người chẳng hạn thì người ta có lý để nghĩ được rằng các chủng khác cũng có thể được sản xuất trong các tế bào gan. Nhưng nhiều khi lại không phải như vậy. Poliovirus phân lập từ tự nhiên có thể sẵn sàng thâm nhiễm các tế bào lympho của người nhưng lại không thể thâm nhiễm được các tế bào cùng dạng của chuột có cùng một quá trình trao đổi chất. Nếu hệ gen RNA của poliovirus được đưa một cách nhân tạo vào trong một tế bào chuột thì virus này có thể sử dụng bộ máy tổng hợp của tế bào chuột để tạo nên các virion mới (đến lượt mình các virus mới này lại có khả năng thâm nhiễm các tế bào người nhưng lại không có khả năng thâm nhiễm lại các tế bào chuột). Điều này cho thấy sự thất bại của poliovirus với việc thâm nhiễm các tế bào chuột không phải là do nguyên nhân thiếu hụt một số khả năng của tế bào chuột để trợ giúp cho các quá trình sinh tổng hợp cần cho sự sao chép của virus. Vì thế, cơ sở của sự chọn lọc không phải ở đây.

Mặc dầu tất cả các tế bào trong cơ thể đều trong một vương quốc đặc biệt, có thể thực hiện được các hoạt động cơ bản giống như mô hình ở Central Dogma, nhưng các tế bào này lại không có cấu trúc bề mặt giống nhau. Như đã đề cập ở trên, các vi khuẩn khác nhau có thể có các nhóm sinh hóa khác nhau trên thành tế bào của chúng. Tương tự như vậy, các tế bào động vật khác nhau có thể có các protein, glycoprotein và glycolipid khác nhau đáng kể trên bề mặt của chúng. Nhiều cấu trúc bề mặt của các tế bào này đều có sự tiến hóa về các nhân tố nhận dạng liên quan tới sự hấp thụ dinh dưỡng, tải nạp các tín hiệu qua màng sinh chất hoặc gắn với các tế bào khác. Các phân tử khác trên bề mặt của các tế bào động vật, các kháng nguyên hòa hợp tổ chức giữ vai trò rất quan trọng trong việc xếp loại những tế bào nào là của mình (self) trong khi tương tác tế bào ở hệ miễn dịch của cơ thể. Sự khác biệt lớn về cấu trúc bề mặt tế bào có liên quan tới việc gắn virus vào bề mặt tế bào vật chủ. Vì thế thang vật chủ của virus phụ thuộc vào khả năng gắn được với các tế bào có mang các protein, glycoprotein hoặc glycolipid bề mặt tế bào đặc hiệu.

Một số dữ kiện khác cũng ủng hộ cho kết luận này. Trực tiếp nhất là các nghiên cứu gen về các quá trình thâm nhiễm của *E.coli* bởi bacteriophage. Trong một plaque (đĩa) thực nghiệm *E. coli* được thâm nhiễm với một virus, chẳng hạn như T3 thì thỉnh thoảng trong đĩa có một khuẩn lạc vi khuẩn mọc lên. Các vi khuẩn từ khuẩn lạc đó lại kháng lại được sự thâm nhiễm của T3. Tương tự như vậy, các vi khuẩn kháng lại sự thâm nhiễm bởi bacteriophage T4 cũng có thể phân lập được từ đĩa thực nghiệm với T4.

Khi phân tích kỹ lưỡng gen của các vi khuẩn lấy từ đĩa T4 thì thấy chúng có một đột biến làm thay đổi cấu trúc các phân tử lipopolysaccharide của thành tế bào. Điều đó chứng minh rằng T4 gắn vào các phân tử lipopolysaccharide gốc (nguyên bản) nhưng không có khả năng nhận dạng và/hoặc gắn với các dạng đột biến. Tuy nhiên thỉnh thoảng trong đĩa T4 cũng có quần thể virus có khả năng thâm nhiễm được các *E.coli* đột biến. Những virion này cũng có những biến đổi về cấu trúc các sợi đuôi (tail fiber). Rõ ràng là những đột biến tương hỗ trên bề mặt tế bào vật chủ và các cấu trúc liên kết virus đã khôi phục lại mối tương quan của thang vật chủ thông thường. Vì thế các tương tác bề mặt tế bào – virus đáp ứng được việc xác định một virus có khả năng thâm nhiễm một tế bào đặc biệt hoặc thang vật chủ là kết quả của sự đồng tiến hóa của các cấu trúc này.



Hình 1.1 Plaque (đĩa) T3 có 8 khuẩn lạc nảy sinh từ các tế bào cá thể, kháng lại sự thâm nhiễm T3. (Theo Bruce A. Voyles. *Biology of Viruses*. Mcgraw-Hill international edition 2002)

Công nghệ DNA tái tổ hợp đã cho phép chứng minh trực tiếp mối quan hệ giữa cấu trúc bề mặt tế bào đặc hiệu và khả năng của một virus động vật thâm nhiễm các tế bào đích của nó. HIV đã được phát hiện là có thể thâm nhiễm các tế bào lympho hoặc các tế bào não bộ có glycoprotein bề mặt CD4. Khi gen của cấu trúc này (của người) được đưa vào các dạng tế bào khác thì các phân tử CD4 có thể được biểu hiện trên bề mặt tế bào của chúng. HIV sau đó có thể thâm nhiễm các tế bào đã được “công nghệ hóa” có các receptor bề mặt tế bào thích hợp.

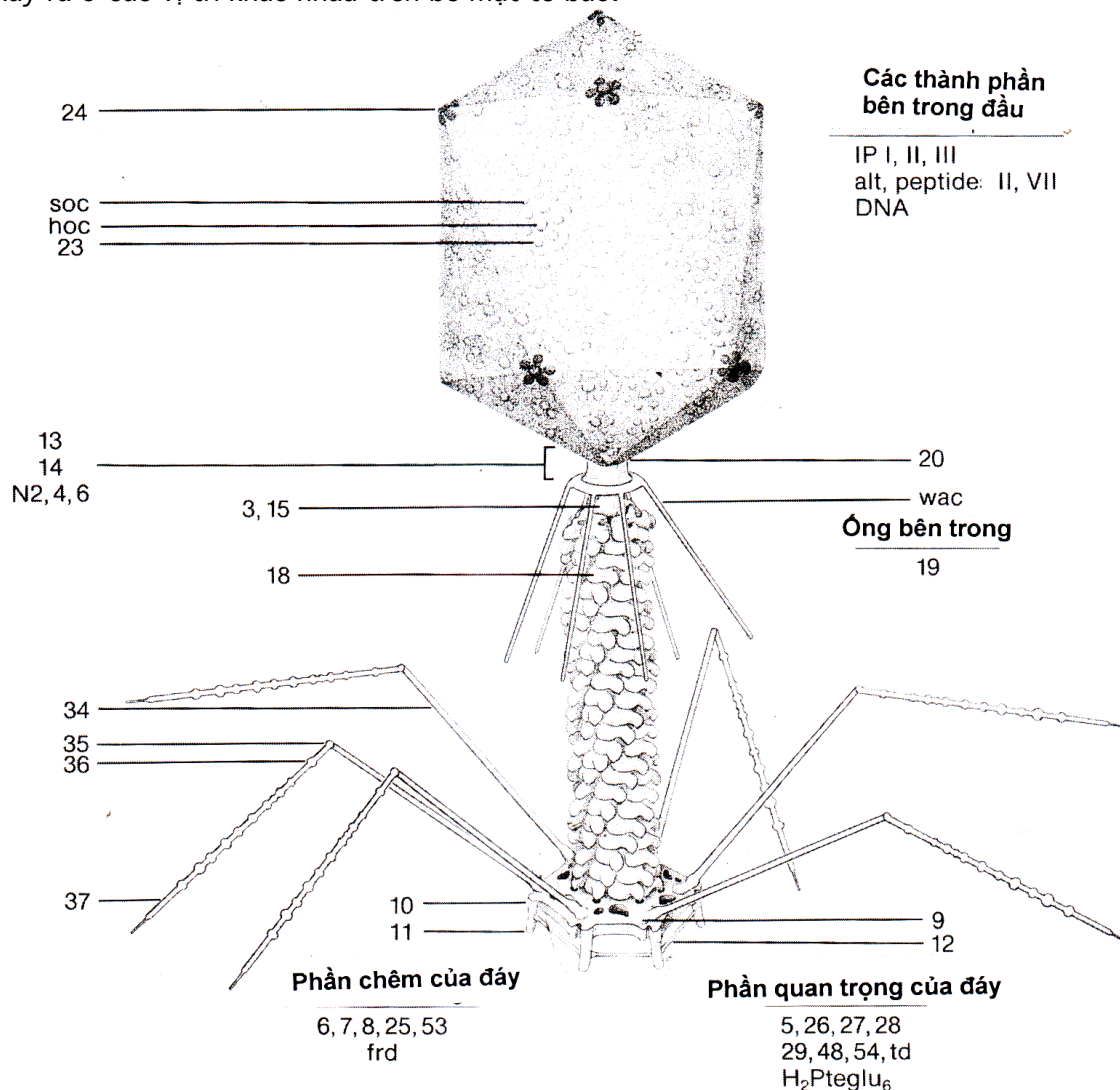
1.3 Sự nhận diện tế bào vật chủ của thực khuẩn thể

Những công trình nghiên cứu di truyền học đã cung cấp những thông tin bổ ích về bản chất của các protein gắn virus và các receptor bề mặt tế bào mà chúng nhận biết được. Khi phân lập các tế bào đột biến kháng thâm nhiễm thì có thể “mổ xẻ” được sự tương tác giữa virus và các tế bào vật chủ của chúng, trong khi đó các kỹ thuật DNA tái tổ hợp lại cho phép chứng minh trực tiếp các đặc tính của các hợp phần khác nhau.

Các receptor tế bào của nhiều thực khuẩn thể đã được sáng tỏ, một số receptor đã được liệt kê ở (Bảng 1.1). Trong các vi sinh vật gram (-) thì lipopolysaccharide (LPS) cho nhiều vị trí gắn, đặc biệt là các loại đường của kháng nguyên O và lõi polysaccharide. Các protein lớp vỏ ngoài cũng có thể là các vị trí nhận dạng. Trong các tế bào gram (+) thì acid teichoic sẽ tạo nên tính đặc hiệu cần thiết. Những thành phần phụ như lông roi và các loại lông khác cũng là các vị trí cho sự gắn kết của thực khuẩn thể.

Thực khuẩn thể T4 gắn vào *E. coli*

Thực khuẩn thể T4 có một virion cực kỳ phức tạp: Một đầu icosahedral và một đuôi xoắn – là nền tảng cho sự gắn kết và có 6 đỉnh và các sợi đuôi (Hình 1.2). Trong tất cả các thực khuẩn thể có cấu trúc phức tạp thì việc gắn kết đều thông qua các thành phần ở đuôi. Khi gắn T4 vào *E. coli* có sự tham gia của các của các thành phần có thể gắn thuận nghịch và bất thuận nghịch mà các nghiên cứu về sinh hóa và di truyền đã chỉ rõ nó có thể xảy ra ở các vị trí khác nhau trên bề mặt tế bào.



Hình 1.2 Cấu trúc của thực khuẩn thể T4. Các protein được đánh số có liên quan tới các quá trình gắn kết và thâm nhập bởi virus này.
(Theo Bruce A. Voyles. *Biology of Viruses*. McGraw-Hill international edition 2002)

Sự gắn kết có thể thuận nghịch của T4 liên quan tới sự tương tác giữa phần ngoại biên của các sợi đuôi virion và các polysaccharide của lipopolysaccharide màng ngoài. Các thí nghiệm trước đã chứng minh rằng các sợi đuôi của T4 sẽ gắn đặc hiệu vào LPS của *E. coli*

và việc gắn này sẽ bị ức chế khi có thêm monosaccharide hay disaccharide đặc hiệu. Các phân tích về sự kháng cự của các thể đột biến đã định vị được vị trí gắn đặc hiệu vào phần đuôi của rất nhiều polysaccharide ở phần lõi ngoài. T4 cũng có thể tấn công các tế bào của nòi *E. coli* K12 mà chuỗi polysaccharide lõi ngoài của nó có nhiều hơn *E. coli* B ba phân tử đường. Vì có các loại đường ở xa vị trí gắn glucose nên nó không cản trở hoàn toàn sự gắn kết, tuy nhiên có thể giảm về hiệu ứng. T4 cũng có khả năng nhận dạng một vị trí gắn thứ hai ở *E. coli* – một protein màng ngoài porin OmpC. Như các số liệu trên (Bảng 1.1) cho thấy việc gắn với LPS và OmpC là hoàn toàn độc lập với nhau vì hiệu ứng chuyển dịch đột biến của chúng đều là bổ sung.

Bảng 1.1 Mối liên quan giữa polysaccharide và các receptor protein đối với hiệu ứng ở các đĩa T4 trên E. coli K12

Nòi	Cấu trúc lipopolysaccharide	Protein OmpC porin	Hiệu ứng của đĩa
Dạng hoang dã	lipidA-KDO-hep-Glu-Glu-GluNAc I I Hep Gal Hep Hep	Có mặt Vắng mặt	1,0 10 ⁻³
Đột biến1	Lipid A-KDO-Hep-Hep-Glu	Có mặt	1,2
Đột biến2		Vắng mặt	0,7
		Có mặt	10 ⁻³
		Vắngmặt	< 10 ⁻⁷

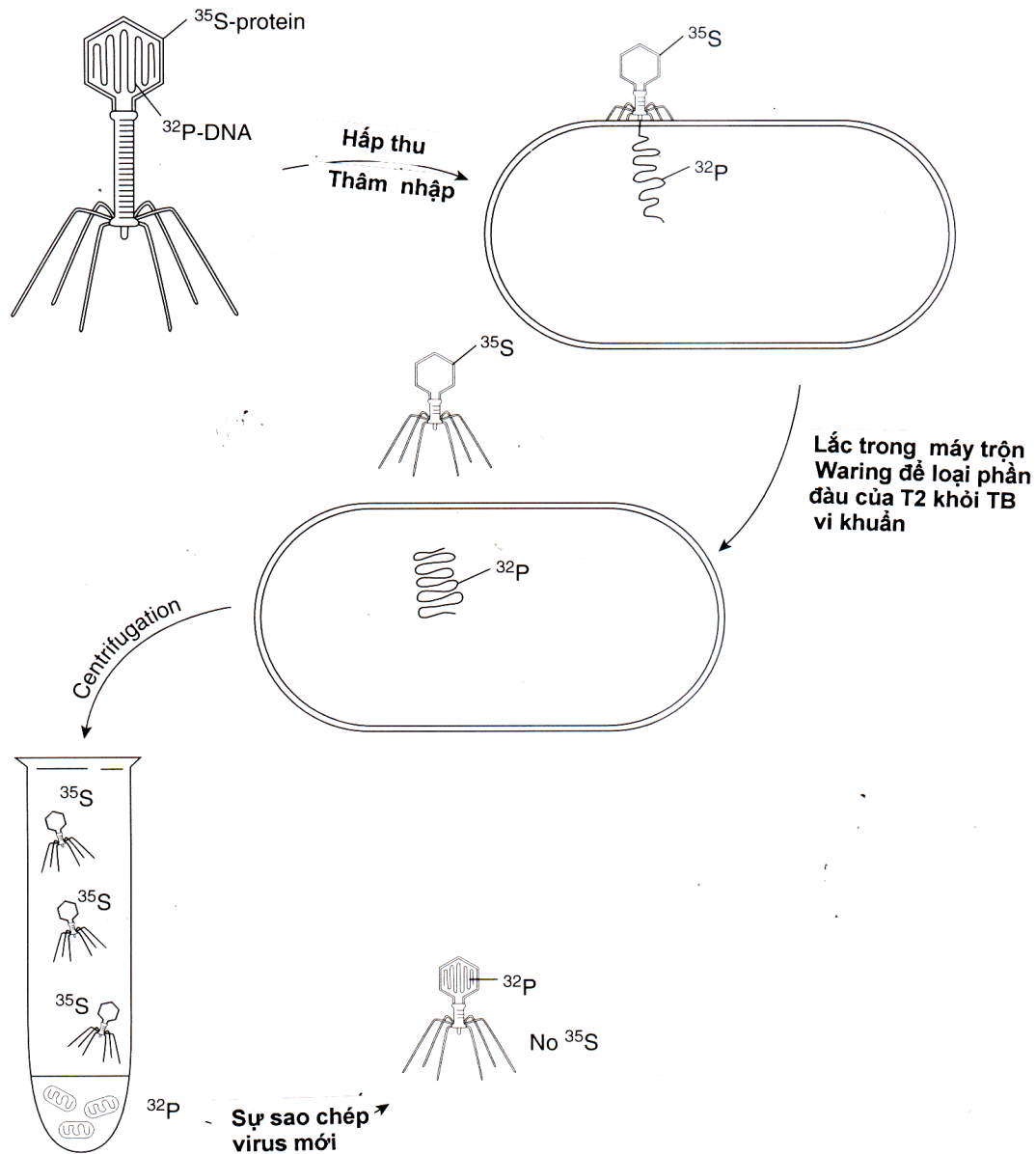
Virion của T4 có 6 sợi đuôi và trên bề mặt tế bào lại tập trung nhiều LDS nên ngay cả khi một liên kết bất kỳ giữa một sợi đuôi nào đó với tế bào được coi là yếu đi nữa thì sau khi sợi đuôi đầu tiên đã được gắn thì kết tốc độ gắn kết của các sợi khác sẽ được tăng lên để tất cả 6 sợi đều tìm được đích và tạo nên sự gắn chọn lọc hiệu quả. Khi cả 6 sợi đã gắn vào thành tế bào thì sẽ có những biến đổi về cấu trúc thành virion để thực hiện sự thâm nhập, đó là pha thứ hai của quá trình gắn kết. Virion sẽ “duyet” trên bề mặt tế bào (thực chất là dao động Brown của tế bào) cho tới khi tìm được vị trí thích hợp trên bề mặt để gắn vào. Những vị trí này có thể nằm ở thành tế bào nơi có sự tổng hợp liên tục các màng sinh chất và các màng ngoài, cái nọ nối tiếp cái kia. Tương tự như vậy, các protein đặc hiệu trong màng là các vị trí gắn kết không thuận nghịch (điều này thực chất chưa được chứng minh). Các nghiên cứu về đột biến phage đã chứng minh rằng sự gắn kết virion bất thuận nghịch là do protein (P12). Chính những vị trí gắn bất thuận nghịch của virion là nơi có thể đưa DNA virus vào trong tế bào vật chủ.

1.4 Các thực khuẩn thể đưa acid nucleic của chúng vào các tế bào vật chủ

Sự gắn kết chỉ là bước đầu tiên trong một quá trình liên tục để đưa hệ gen virus vào trong tế bào vật chủ. Sự thâm nhập và lột vỏ (uncoating) là thuật ngữ để xác định rằng đó là giai đoạn thứ hai kế tiếp, trong đó acid nucleic của virus từ virion đi vào các tế bào vật chủ (thâm nhập) và nếu cần thì nó sẵn sàng biểu hiện (lột vỏ). Sự phức tạp về sinh

hóa và độ dày của thành tế bào vi khuẩn đã đặt cho sự thâm nhập có một nhiệm vụ to lớn là phải gắn vào được các cấu trúc đó. Sự truy nhập trực tiếp tới màng tế bào bởi lông roi và các lông khác đủ khả năng làm cho quá trình gắn kết của virus trở nên dễ dàng hơn.

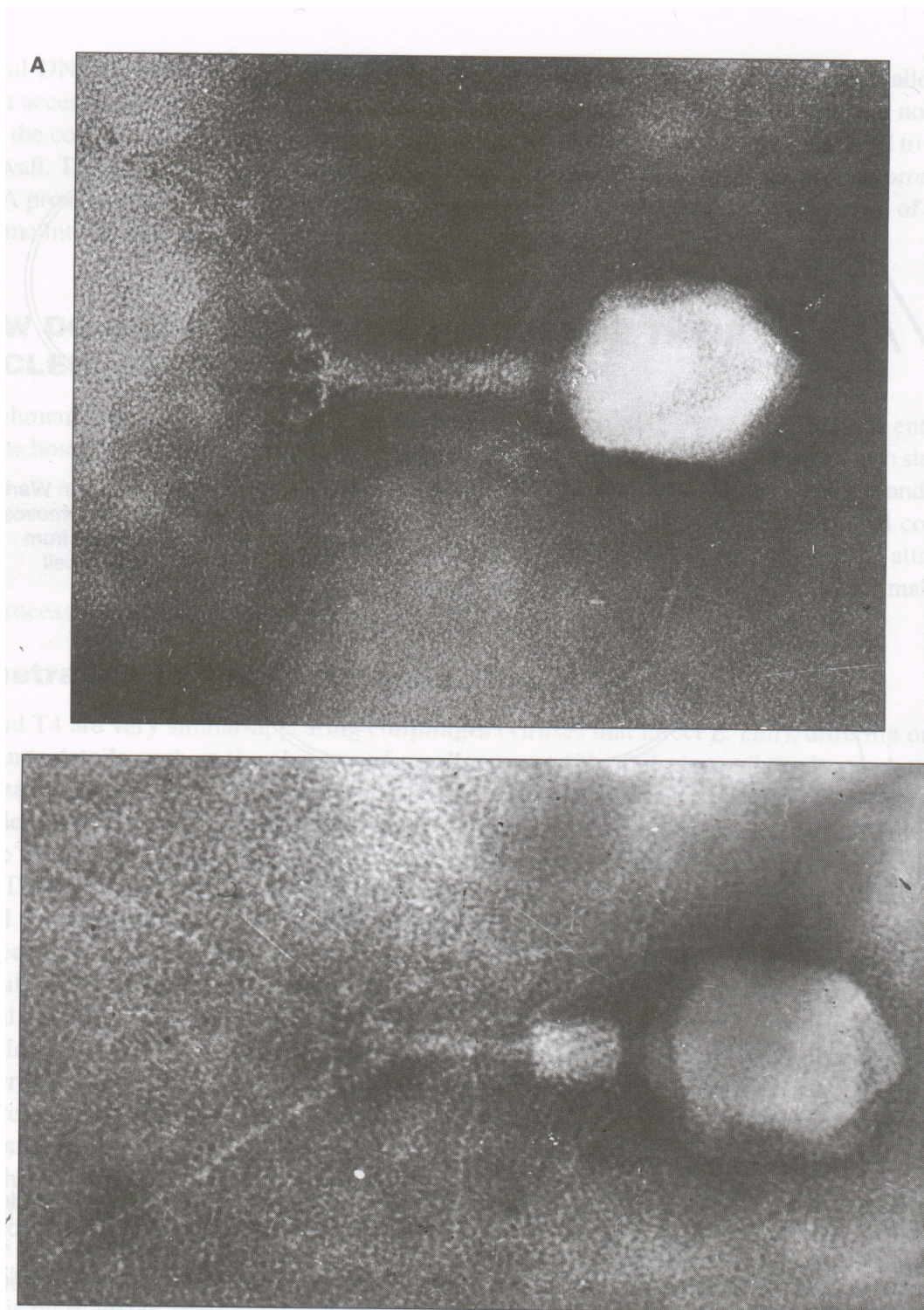
Sự thâm nhập bởi coliphage T2 và T4



Hình 1.3 Thí nghiệm của Hershey-Chase. Thực khuẩn thể có các protein đánh dấu với ^{35}S và DNA được đánh dấu với ^{32}P cho tương tác với các tế bào vật chủ, sau đó dung dịch này được lắc mạnh trong máy trộn Waring. Sau khi ly tâm, hầu hết protein đánh dấu ^{35}S có mặt ở phần dịch nổi, còn DNA đánh dấu ^{32}P sẽ được viên tròn lại cùng với các tế bào vật chủ.

T2 và T4 là các coliphage (virus thâm nhiễm *E.coli*) rất giống nhau, chúng chỉ khác nhau về những chi tiết nhỏ chẳng hạn như không có phần cổ bao quanh đuôi - nơi mà nó gắn vào phần đầu của virion. Các thí nghiệm kinh điển của Albert Hershey và Martha Chase lần đầu tiên đã chứng minh rằng chỉ có acid nucleic của thực khuẩn thể (TKT) đi vào trong các tế bào vật chủ, còn các protein capsid của virion thì không. Như trên (Hình 1.3), các DNA của thực khuẩn thể T2 được đánh dấu với ^{32}P còn protein thì được đánh dấu với ^{35}S rồi cho gắn vào các tế bào vật chủ *E.coli* bằng cách lắc mạnh trong máy trộn Waring. Cách xử lý này đảm bảo chắc chắn rằng bất kỳ liên kết nào giữa các thành phần của virus với bề mặt tế bào cũng bị phá vỡ. Hershey và Chase phát hiện các khối DNA đánh dấu ^{32}P đã đi vào các tế bào *E.coli*, trong khi đó các protein của capsid được đánh dấu với ^{35}S thì vẫn ở bên ngoài tế bào vật chủ.

Vậy thì các DNA từ phần đầu của virion đi vào tế bào chất của tế bào vật chủ như thế nào? Trên ảnh chụp (Hình 1.4) thấy rõ ràng là sự thâm nhập có liên quan nhiều tới sự biến đổi cấu trúc của các virus này, đặc biệt là cấu hình chung của các protein màng ngoài bao quanh ống đuôi của virion. Nói theo cách truyền thống thì những hình ảnh này đã cho thấy có “sự hợp đồng” với màng ngoài tạo lực cho ống đuôi đi qua thành tế bào để rồi tiếp xúc được với màng sinh chất để “tiêm” DNA virus vào bên trong tế bào vật chủ. Tuy nhiên, cách xử lý giống như việc dùng một syringe tiêm vào dưới da thì vẫn có thể bị lạc đường, virus không thể tiếp xúc được với màng ngoài tế bào vật chủ vì nó đã được tổ chức lại. Trong quá trình mở rộng cấu hình của màng ngoài thì thấy nó được tạo bởi 144 bản phiên mã các protein đơn (gp18) xếp thành các nhóm 6 với 24 vòng quanh ống đuôi. Khoảng cách thẳng đứng giữa các dưới đơn vị của vòng là 4,1 nm. Cấu trúc tổng quát bao quanh ống đuôi là một vòng xoắn với góc xoắn là 17° (tức là mỗi protein được dịch sang phải 17° so với protein dưới). Quá trình thâm nhập này được khởi đầu bằng sự thay đổi cấu trúc ở các sợi đuôi gắn với thành tế bào. Đến lượt mình, những cấu trúc ở các sợi đuôi này sẽ làm thay đổi trình tự các protein dạng nền (baseplate) (Hình 1.5 A). Ở trạng thái đầu các protein nền được sắp xếp một cách chặt chẽ thành các hình lục giác (hexagon) bao quanh ống đuôi. Sự xuất phát này làm cho protein nền được mở rộng thành cấu trúc “hình sao” và kết quả là liên kết giữa phần đáy của protein màng ngoài với ống đuôi bị yếu đi. Như trên (Hình 1.5 B) các protein màng ngoài rút xuống chỉ còn 12 vòng, như vậy vòng xoắn mới ngắn hơn này có góc xoắn là 32° và khoảng cách giữa các vòng là 1,5 nm. Do sự sắp xếp lại các protein màng ngoài này mà ống đuôi rơi được vào thành tế bào và tiếp xúc được với màng sinh chất. Khi tiếp xúc với màng sinh chất thì DNA của T4 được tổng ra khỏi đầu của virion thông qua ống đuôi. Các nghiên cứu di truyền học đã chỉ rõ DNA có thể có protein hoa tiêu (pilot protein) để gắn với các đầu cuối của nó tạo điều kiện trợ giúp cho việc chuyển DNA thông qua ống đuôi và khởi đầu sự sao chép DNA bên trong các tế bào vật chủ *E.coli*. (cũng phải lưu ý rằng Hershey và Chase rất sung sướng vì protein này không có nhiều aminoacid chứa lưu huỳnh). Thực ra ống đuôi không thực sự xuyên qua màng, nhưng khi tương tác với nó thì sẽ hình thành nên một cái lỗ ở ống, thông qua đó mà DNA có thể đi qua được.



Hình 1.4 So sánh cấu trúc của thực khuẩn thể T4 trước (A) và sau (B) khi thâm nhập. Bao xung quanh ống đuôi ngắn hơn và dày hơn sau khi thâm nhập, phần đầu thì đã trống rỗng. (Theo Bruce A. Voyles. *Biology of Viruses*. Mcgraw-Hill international edition 2002)

A



Hình sáu cạnh



Hình sao

Hình 1.5 Thay đổi cấu trúc ở phần đuôi T4 trong khi thâm nhập. A, khởi đầu sự thâm nhập có sắp xếp lại các protein có tổ chức rắn chắc (hình sáu cạnh) để trở thành dạng nổi lỏng hơn (hình ngôi sao).

(Theo Bruce A. Voyles. *Biology of Viruses*. Mcgraw-Hill international edition 2002)

1.5 Sự nhận diện tế bào vật chủ của những virus động vật

Bề mặt tế bào động vật có nhiều protein, glycoprotein và glycolipid và virus có thể lựa chọn được một receptor từ các phân tử này. Một số mẫu “phàm ăn” (gourmet) dường như là đa năng hơn vì thế mà thang vật chủ rộng. Mặt khác, các virus này lại có thể chỉ chọn lựa các receptor đặc biệt cho chúng vì thế mà thang vật chủ của chúng lại rất hẹp. Mặc dầu sự kết hợp virus - tế bào vật chủ là do các receptor, nhưng về bản chất vẫn là sự tương tác tĩnh điện.

1.5.1 Sự gắn kết qua các virus trần

Mặc dù có các đỉnh giống như adenovirus nhưng tất cả các virus động vật không vỏ đều gắn vào các tế bào vật chủ thông qua sự tương tác trực tiếp giữa capsid của chúng với các phân tử receptor tế bào. Bản chất của các tương tác này được biết rõ nhất là sự tương tác của piconarvirus – một virus RNA (pico tiếng Hy Lạp nghĩa là nhỏ) mà các thành viên của nó bao gồm các enterovirus (poliovirus, coxsackievirus [tên của Coxsackie, New York] và echovirus [enteric, cytopathic, human, orphan {liên quan tới một bệnh không đặc hiệu}], các rhinovirus C (rhino theo tiếng Hy Lạp tức là bệnh thuộc “miệng” gây nên bởi một nấm men, trong khi đó aphthovirus lại gây các bệnh giống như long móng lở mồm (hoof and mouth disease – gây nên bởi nhiều nguyên nhân) và cardiovirus (cardio theo tiếng Hy Lạp là tim).

Bảng 1.2 Những khác biệt trong các receptor bề mặt tế bào vật chủ được chứng minh bởi sự phân giải enzyme.

Virus	Enzyme		
	Trypsin	Chymotrypsin	Neuraminidase
Poliovirus	Loại bỏ (receptor)	Có mặt	Có mặt
Rhinovirus	Loại bỏ	Có mặt	Có mặt
Echovirus	Có mặt	...	...
Virus Coxsackie B	Có mặt	Loại bỏ	Có mặt
Cardiovirus	Có mặt	Loại bỏ	Loại bỏ

Các nghiên cứu nuôi cấy từ lâu đã chỉ rõ rằng các receptor tế bào vật chủ có thể được chia thành từng nhóm dựa trên cơ sở sự gắn kết của các piconarvirus với chúng. Phương pháp chứng minh cho mối liên quan này đang xác định tính nhạy cảm của các cấu trúc bề mặt tế bào đối với sự phân giải của enzyme ở các vị trí phân tử khác nhau. Những số liệu được tóm tắt trong (Bảng 1.2) cho thấy cấu trúc của các receptor ngay ở các trong các dưới nhóm piconarvirus vẫn có thể khác nhau. Chẳng hạn như khi xử lý các tế bào vật chủ với enzyme trypsin thì nó sẽ phân giải các receptor của poliovirus và rhinovirus, nhưng lại không liên quan gì tới echovirus và virus coxsackie B. Các nghiên cứu cũng tái xác định khả năng cạnh tranh trực tiếp về sự gắn kết của các virus. Chẳng hạn như khi làm bão hòa bề mặt tế bào với bất kỳ poliovirus nào thì cũng không ngăn chặn được sự gắn kết của rhinovirus người với các tế bào tương tự. Điều đó chứng tỏ rằng vị trí của các receptor poliovirus và rhinovirus có sự phân biệt rõ rệt ngay cả khi chúng bị phân giải bởi cùng một loại enzyme.

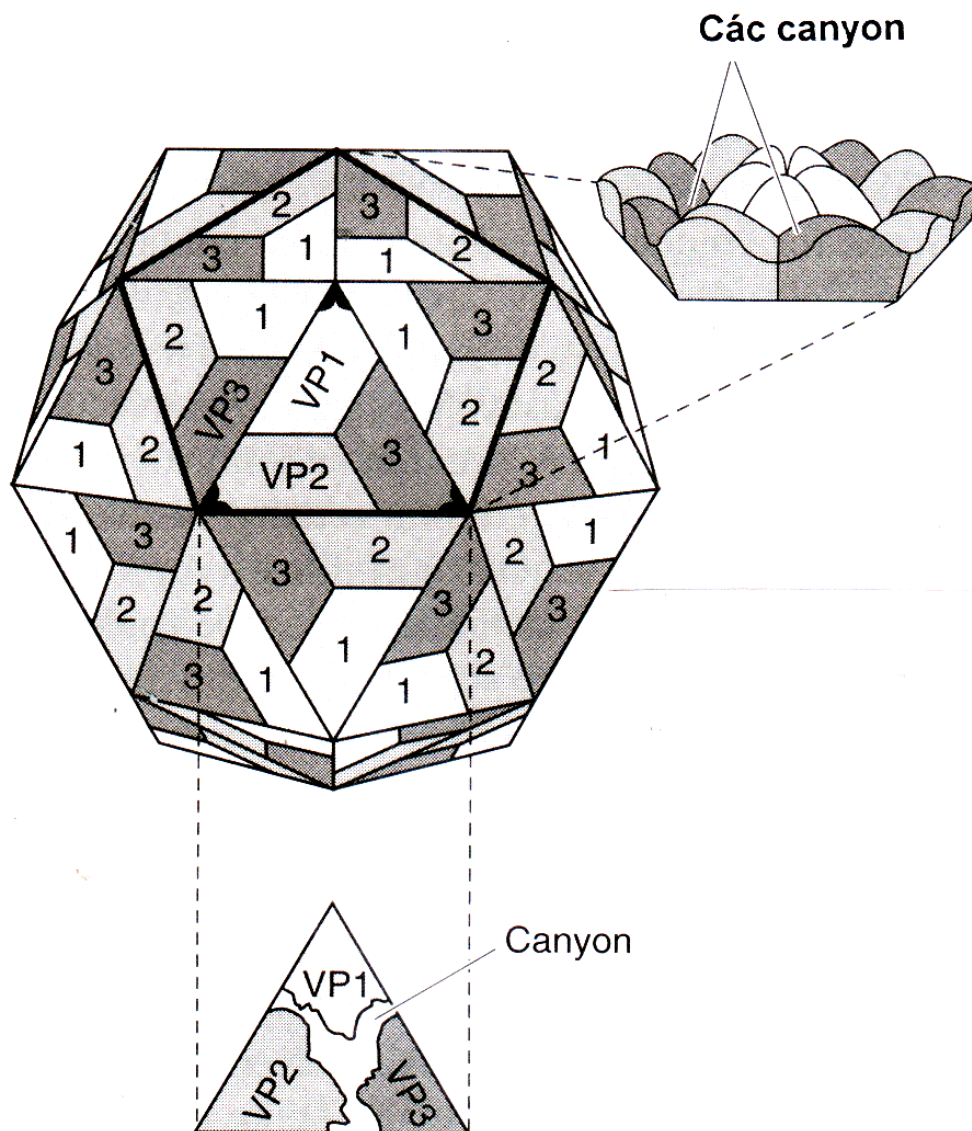
Gần đây các kháng thể đơn dòng kháng trực tiếp các phân tử bề mặt tế bào vật chủ đã được sử dụng để phân biệt các receptor. Chế phẩm kháng thể đơn dòng là một kháng thể đơn của một dòng tế bào *in vitro*. Kháng thể đơn dòng có khả năng gắn với các cấu trúc sinh hóa nhỏ bé đặc hiệu. Các nghiên cứu về sự cạnh tranh đã chỉ rõ rằng kháng thể đơn dòng kháng receptor của poliovirus không can thiệp vào việc gắn kết của rhinovirus vào bề mặt tế bào cùng loại và ngược lại các kháng thể đơn dòng kháng receptor của rhinovirus lại không ngăn chặn được sự gắn kết của poliovirus.

Công nghệ DNA tái tổ hợp cho phép xác định được các đặc trưng phân tử receptor tế bào của cả poliovirus và rhinovirus người. Các tế bào động vật không có khả năng gắn vào các virus này có thể được xử lý bằng cách cho hấp thụ và hợp nhất các phân tử DNA

người trong một quá trình được gọi là sự *thâm chuyển* (transfection). Một số tế bào có thể nhận được các thông tin về receptor virus vì thế mà các cấu trúc mới đã được biểu hiện trên bề mặt tế bào của chúng. Các dòng tế bào này đã được xác định lần đầu tiên bởi các kháng thể đơn dòng và sự nhận diện đó đã được khẳng định bởi các nghiên cứu về thâm nhiễm. Quá trình này tạo điều kiện để phân lập và sau đó giải trình tự DNA mã cho các receptor của poliovirus cũng như rhinovirus. Các trình tự cho thấy các receptor này đều thuộc thành viên của họ protein miễn dịch supergene (immunoglobulin-supergene family of proteins). Các glycoprotein hợp nhất màng này có liên quan rất nhiều tới sự nhận dạng và các hoạt tính gắn kết của hệ miễn dịch hoặc sự thông tin tế bào. Receptor của rhinovirus được phát hiện là một phân tử kết dính nội bào-1 (intercellular adhesion molecule -1 [ICAM-1], trước đây được xác định là có khả năng gắn kết với một phân tử trên bề mặt tế bào lympho. Chức năng tế bào của các receptor poliovirus vẫn chưa được rõ.

Vì rhinovirus rất nhỏ nên cấu trúc của protein capsid trong virion của nó phải xác định bằng tinh thể học tia x (X-ray crystallography). Những nghiên cứu này đã chỉ rõ có 3 dưới đơn vị cấu trúc tạo nên capsid, chúng được sắp xếp theo kiểu một “thung lũng” (canyon) dọc theo capsomer Hình 1.6). Khi 6 capsomer đã xếp vòng quanh một đỉnh thì các canyon sẽ quay vòng quanh điểm đó. Các aminoacid trong canyon có sự chuyển đổi rất cao ở nhiều rhinovirus, khi đó trên bề mặt capsomer có sự thay đổi nhiều nhất. Một số dẫn liệu ủng hộ cho giả thuyết này chỉ rõ rằng các aminoacid trong các canyon có liên quan tới việc gắn kết của receptor. Trước hết, kích cỡ của canyon trong rhinovirus người là thích hợp cho vị trí gắn ICAM-1 được hiểu là receptor của rhinovirus. Thứ hai là sự thay đổi cảm ứng hóa học hoặc những đột biến trong các aminoacid đó cũng như các loại thuốc làm thay đổi cấu hình của các canyon đều can thiệp vào sự gắn kết của rhinovirus với các receptor của nó. Cuối cùng, việc sinh kháng thể kháng lại các trình tự của các aminoacid đã chuyển đổi trong canyon sẽ ngăn ngừa được sự thâm nhiễm các tế bào đích.

Các piconavirus cũng định vị các vị trí gắn của chúng trên một lỗ hổng (cavity) trên bề mặt virion. Trong cardiovirus thì lỗ hổng này có dạng như các “hầm” (pit) hơn là canyon giữa các tiểu đơn vị cấu trúc. Tuy nhiên, một nhóm khác của piconavirus –aphthovirus lại có cách tiếp cận trái ngược, các vị trí gắn của virion được xếp trên các vòng protein ở bề mặt virion.



Hình 1.6 Mô hình sự hình thành vị trí gắn kết canyon từ các tiểu đơn vị cấu trúc capsomer của rhinovirus.

(Theo Bruce A. Voyles. *Biology of Viruses*. Mcgraw-Hill international edition 2002)

Một nhóm khác của virus động vật không vỏ làm nhiệm vụ của một aphthovirus tốt hơn. Các adenovirus có một cái đinh hay một sợi mảnh, dài có núp ở cuối gắn với 12 đỉnh của acpsid. Các adenovirus người được xếp thành các dưới nhóm dựa trên cơ sở khả năng ngưng kết của virus với hồng cầu khỉ rhesus hoặc hồng cầu chuột. Phản ứng này có tên là ngưng kết hồng cầu (hemagglutination) (tiếng Hy Lạp “heme” tức là máu và *agglutina* theo tiếng Latin là “gắn kết”). Nhiều virus có vỏ và virus trần đều có thể gây phản ứng ngưng kết hồng cầu. Vì mỗi virus chỉ có thể tương tác với các dạng đặc biệt của hồng cầu

nên test ngưng kết hồng cầu hay được sử dụng nhất trong các phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, việc gắn với hồng cầu thực ra là hiểm họa cho virus vì hồng cầu không thực hiện được các quá trình Central Dogma cho nên những tế bào như thế hoàn toàn không có khả năng trợ giúp cho sự tái sinh của virus.

Các đỉnh của adenovirus là cấu trúc xoắn ba cứng được tạo nên từ 3 protein sợi đồng nhất. Các aminoacid cuối C của mỗi sợi hình thành nên các khối cầu cùng với một núm lõm sâu ở mặt ngoài của nó. Các dưới nhóm khác nhau của adenovirus gắn với các cấu trúc bề mặt tế bào khác nhau. Nhiều dưới nhóm sử dụng một phân tử gọi là *car* (coxsackie virus và receptor adenovirus, vì thế nên cả hai dạng virus đều sử dụng cùng một loại phân tử), đó là một thành viên của siêu họ immunoglobulin. Một dưới nhóm khác lại sử dụng phân tử hòa hợp tổ chức lớp I – cũng là thành viên của cùng siêu họ này. Một dưới nhóm khác lại sử dụng các phân tử integrin như là receptor của nó. Những virus nhận diện được receptor bề mặt có một số aminoacid phân biệt ở phần núm lõm sâu, điều đó chứng tỏ đây là nơi xảy ra phản ứng gắn kết.

Các adenovirus tương đối thiếu hiệu quả trong việc gắn và thâm nhập vào trong các tế bào vật chủ của chúng. Trên thực tế, việc gắn phần núm với receptor của nó là cần thiết nhưng chưa đủ khả năng cho phép virus đi vào được bên trong tế bào vật chủ. Các quan sát này thấy ở nhiều virus khác nhau, điều đó chứng tỏ rằng cần phải có một phản ứng thứ hai nữa thì mới thực hiện được quá trình thâm nhập.

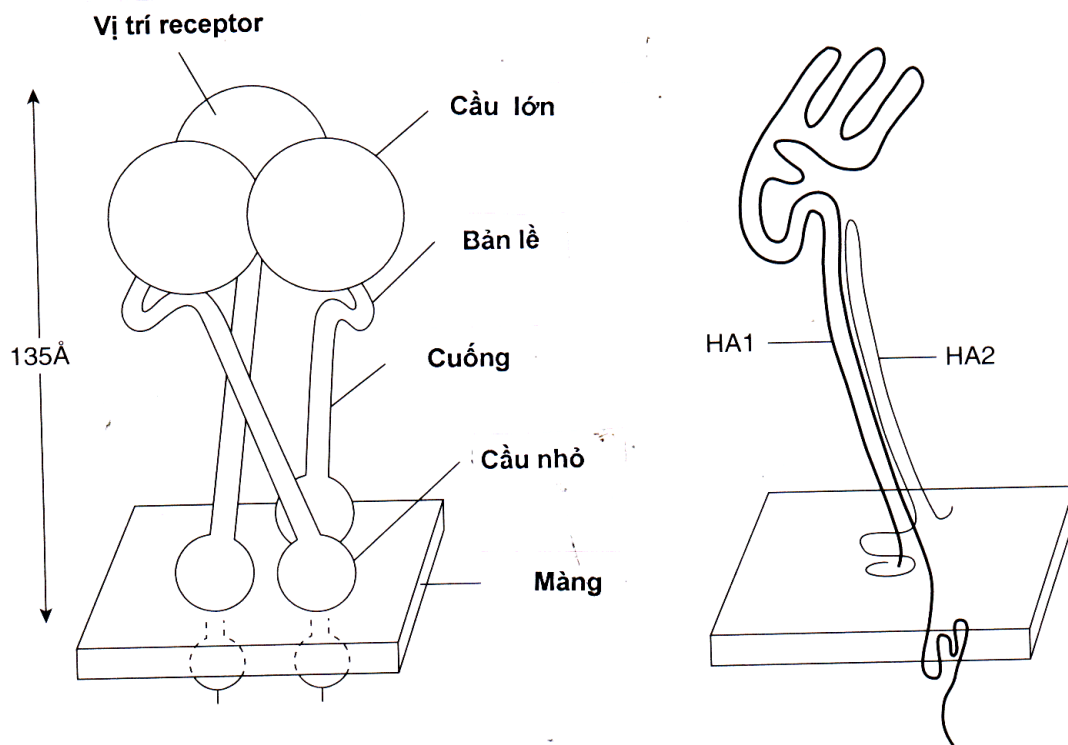
1.5.2 Sự gắn kết qua các virus có vỏ

Nhiều nhóm virus động vật có lớp vỏ bao quanh các nucleocapsid. Lớp vỏ này có nguồn gốc từ màng tế bào vật chủ (thường là màng sinh chất) nhưng lại chứa protein hay glycoprotein virus. Các protein virus có liên quan tới sự gắn kết của virion với các receptor tế bào vật chủ, từ trên mặt vỏ thường tạo nên các phần lồi ra hoặc các cấu trúc hình cái đinh. Các protein hình chiếc đinh của các virus khác nhau đều có cùng một vài cấu trúc thông thường. Ngược lại, bản chất của sự nhận dạng các receptor tế bào vật chủ của các virus có vỏ lại rất khác nhau. Cũng như tên của chúng đã chỉ rõ, cả orthomyxovirus (*ortho* tiếng Hy Lạp là “thẳng”, còn *myxo* là “chất nhầy”, có chứa phức hợp mucopolysaccharide) và paramyxovirus (*para* tiếng Hy Lạp là “bên trên” hoặc bên “ngoài”), các thành viên của nhóm này đều được phát hiện là chúng sử dụng carbohydrate như là các phân tử nhận diện tế bào vật chủ. Hai glycoprotein trong các đỉnh của vỏ virion ở virus influenza A (một orthovirus) đã được nghiên cứu kỹ càng. Một glycoprotein có tên là HA vì nó có hoạt tính ngưng kết hồng cầu – có liên quan tới sự nhận diện các tế bào vật chủ. Những biến đổi trong trình tự amino acid của glycoprotein này giữ vai trò rất lớn đối với sự phát triển các nòi mới của virus có thể tạo dẫn tới dịch. Một glycoprotein khác được gọi là NA vì nó có hoạt tính của neuraminidase – không liên quan tới sự gắn kết bề mặt tế bào, nhưng có thể có vai trò trong việc lắp ráp và phóng thích các virion mới.

Không giống các núm của adenovirus, virus ngưng kết hồng cầu influenza A lại có 2 dưới đơn vị peptide được gọi là HA1 và HA2. Các gen của HA1 và HA2 đã được giải trình tự và cấu trúc bậc ba của toàn bộ phân tử HA đã được xác định bằng tinh thể học tia X. Phức hợp HA toàn phần được thể hiện trên (Hình 1.7). HA1 (gồm 328 amino acid) tạo nên một hình cầu lớn có cuống nối với các cầu nhỏ ở mặt vỏ rồi đi qua lớp vỏ để neo vào toàn bộ phân tử. HA2 (221 amino acid) tạo nên cả cuống và cầu nhỏ. Đỉnh HA toàn phần

trên lớp vỏ là một trimer được tạo bởi 3 phân tử HA1/HA2. Ba quả cầu lớn này đều chứa các túi nhỏ hoặc các vị trí gắn acid N-acetyl-neuraminic – một phân tử có trong nhiều glycoprotein và glycolipid bề mặt tế bào nhiều dạng tế bào. Cũng như trường hợp về vị trí gắn kết của rhinovirus đã trình bày ở trên, các amino acid (cả phân cực và không phân cực) trong các vị trí gắn của influenza đều có sự chuyển đổi rất mạnh, trong khi đó các amino acid xung quanh túi lại có những biến đổi gen đáng kể.

Các đỉnh ở lớp vỏ của virus Sendai (một paravirrus) cũng nhận dạng được bộ phận acid N-acetyl-neuraminic có chứa glycolipid trong màng sinh chất của tế bào vật chủ. Điều này được thấy rõ bằng cách xử lý các tế bào vật chủ với enzyme neuraminidase (để loại acid neuraminic tận cùng khỏi glycolipid đích). Việc xử lý enzyme này đã ngăn cản sự nhận diện của virion. Sự gắn kết có thể được hồi phục nếu thay thế các glycolipid màng sinh chất bằng glycolipid có acid neuraminic ngoại sinh. Glycoprotein của đỉnh đáp ứng cho sự gắn kết ở virus Sendai gọi là HN vì nó có cả hoạt tính ngưng kết hồng cầu (hemagglutinin) và cả neuraminidase để tạo nên một dimer và tetramer trên bề mặt lớp vỏ tương tự như trimer của protein HA trong virus influenza.



Hình 1.7 Mô hình trimer của virus influenza gây ngưng kết hồng cầu. Phân tử HA phía bên phải có liên quan với peptide HA1 và HA2.

(Theo Bruce A. Voyles. *Biology of Viruses*. McGraw-Hill international edition 2002)

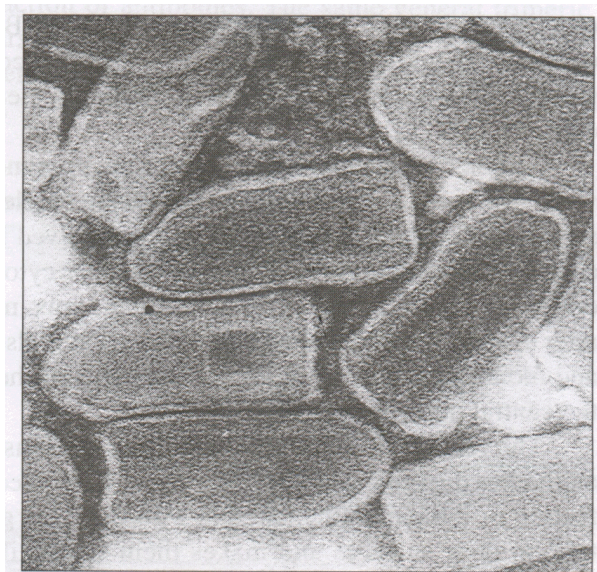
Mặc dầu thường là các acid N-acetyl-neuraminic mới liên quan tới sự gắn kết, nhưng người ta cũng phát thêm nhiều phân tử khác nữa cũng có liên quan. Chẳng hạn như virus herpes simplex 1 và 2 (cũng được gọi là virus herpes người 1 và 2) có các nucleocapsid icosahedral bao quanh các vỏ với nhiều đỉnh nhỏ có chứa các glycoprotein virus. Các nghiên cứu về ức chế chỉ rõ việc gắn virus herpes simplex vào các tế bào vật chủ là một

quá trình gồm 2 bước, bắt đầu bằng việc gắn các đỉnh của virion vào các phân tử của chất nền ngoại bào nhiều hơn là với bên mặt tế bào. Các glycoprotein của đỉnh có tên là gB và gC khởi đầu gắn với heparan sulfate- một polysaccharide dài chứa sulfate liên kết đồng hóa trị (covalent) với một lõi protein đặc biệt thường thấy ở mô liên kết. Vì liên kết ở heparan sulfate có ái lực thấp, nên các virion sẽ gắn được vào bề mặt tế bào thông qua các glycoprotein khác của đỉnh để khởi đầu quá trình thâm nhập.

Rhabdovirus (*rhabdo* tiếng Hy Lạp là “que”) thường có hình quả đậu nó được tạo ra bởi một lớp vỏ bao quanh một nucleocapsid (Hình 1.8). Lớp vỏ này được che phủ bởi các đỉnh nhô ra, nó là sản phẩm một gen đơn của virus (gen G). Rhabdovirus có thang vật chủ cực kỳ rộng. Một số chỉ thâm nhiễm được các mẫu trong các lớp khác nhau trong cùng một giới (chẳng hạn như động vật có vú và côn trùng), nhưng cũng có trường hợp lại thâm nhiễm được các mẫu hoàn toàn khác biệt (chẳng hạn như côn trùng và thực vật). Khả năng gắn kết với các dạng tế bào có những khác biệt rất lớn chứng tỏ rằng virus nhận diện được nhiều cấu trúc bề mặt của rất nhiều tế bào khác nhau.

Các virus gây bệnh ở miệng (vesicular stomatitis virus – VSV) có thể thâm nhiễm được cả các tế bào côn trùng cũng như các tế bào của động vật có vú. Sự gắn kết của VSV với các receptor bề mặt tế bào của nó có thể được ức chế bằng cách xử lý các tế bào đích với phospholipase C (chứ không phải với protease hoặc neuraminidase). Điều này chỉ rõ rằng các receptor của VSV có lẽ là một phospholipid hơn là một protein hay glycoprotein. Các nghiên cứu về ức chế cạnh tranh với các phospholipid khác nhau chỉ rõ chỉ có phosphatidyl serine thì mới ức chế hoàn toàn sự thâm nhiễm VSV của các tế bào động vật có vú. Như vậy các cấu trúc màng thông thường này có thể lại là các phân tử receptor của tế bào vật chủ.

Virus rabies - một rhabdovirus khác có thang rất rộng về thâm nhiễm (mặc dầu tất cả các mẫu đều thuộc động vật có vú) với một quá trình đặc biệt mà kết cục là virus trước tiên vào trong hệ thần kinh ngoại biên sau đó tới hệ thần kinh trung ương. Sự hướng thần kinh này (trope tiếng Hy Lạp là “quay”) có vẻ là kết quả của việc virus rabies sử dụng receptor bề mặt để đi vào bên trong các tế bào đích. Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng các receptor bề mặt chủ yếu của virus rabies trong các tế bào thần kinh là receptor nicotinic acetylcholine mà các neuron động vật có vú biểu hiện ở khớp nối cơ thần kinh. Việc gắn virus rabies vào các khớp nối cơ thần kinh có thể bị ức chế bởi neurotoxin vì nó có ái lực cao đối với các receptor acetylcholine. Hơn nữa, các trình tự amino acid gắn với receptor acetylcholine lại rất giống trình tự ở vùng gắn trong protein của đỉnh (protein G) của virus rabies. Tuy nhiên, những tế bào không có receptor acetylcholine cũng có thể bị thâm nhiễm bởi virus rabies, vì vậy protein G chắc còn có khả năng nhận diện được các receptor khác nữa. Chúng có thể là phospholipid hay glycolipid vì các phân đoạn màng tế bào hòa tan trong chloroform-methanol có thể gắn được với virus rabies. Mối quan hệ giữa các hoạt tính gắn này (nếu có) vẫn chưa được rõ.



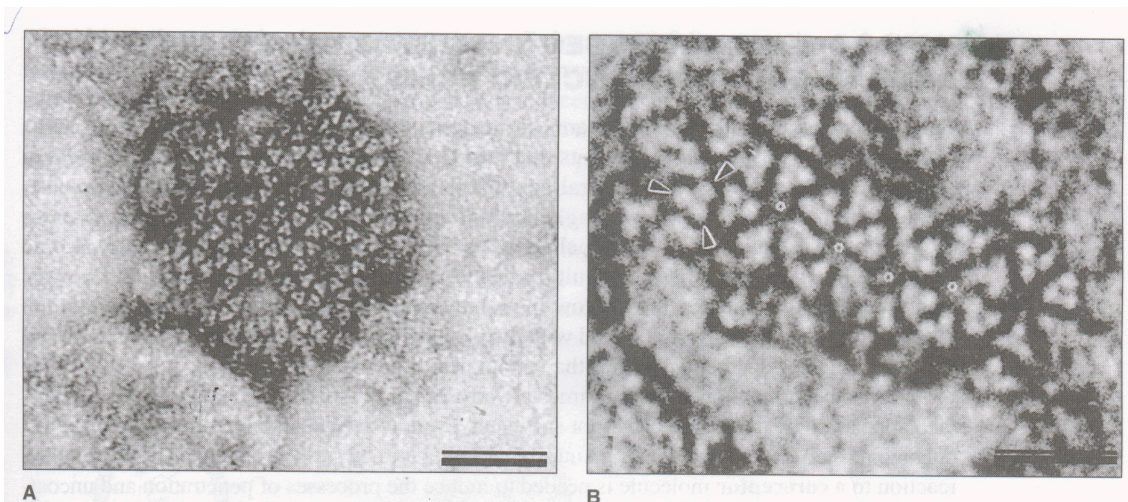
Hình 1.8 Hình nhuộm âm bản virus gây bệnh ở miệng (vesicular stomatitis virus) cho thấy các đỉnh nổi rõ trên mặt vỏ.

(Theo Bruce A. Voyles. *Biology of Viruses*. Mcgraw-Hill international edition 2002)

Nhiều virus khác cũng sử dụng các cấu trúc bề mặt tế bào chuyên hóa của các dạng tế bào đặc biệt như là các receptor của chúng. Virus Epstein-Bar (EBV) là một herpes virus có liên quan tới mononucleosis lan truyền và một vài dạng ung thư của người (u lympho Burkitt và ung thư mũi họng). Các tế bào đích của EBV là lympho B. Một vài nghiên cứu đã sử dụng kháng thể đơn dòng xác định rằng EBV nhận dạng được các glycoprotein bề mặt của lympho B lớn, có liên quan tới việc gắn enzyme phân cắt của thành phần thứ ba của vỏ thể (C3d).

Một virus khác thâm nhiễm các tế bào của hệ miễn dịch là HIV. Receptor của HIV là phân tử CD4 có ở bề mặt các tế bào lympho T giúp đỡ và nó có liên quan tới sự nhận diện các kháng nguyên hòa hợp tổ chức chính trên các lympho B hoặc lympho T độc tế bào. Mặc dầu HIV được xác định nguyên bản là một virus hướng lympho T, nhưng nhiều dạng tế bào khác cũng có thể bị thâm nhiễm. CD4 cũng được biểu hiện trên bề mặt đại thực bào và các tế bào đơn nhân, chúng cũng là các thành phần của hệ miễn dịch cũng như các tế bào thần kinh đệm trong hệ thần kinh trung ương.

Vai trò receptor của CD4 đã được chứng minh bằng nhiều phương pháp, chẳng hạn như sử dụng các kháng thể đơn dòng kháng trực tiếp CD4 để ngăn ngừa sự thâm nhiễm HIV của các lympho T. Hơn nữa, thâm chuyển các tế bào biểu mô bì với gen CD4 thì sẽ biểu hiện protein CD4 trên bề mặt của chúng và làm chúng dễ bị ảnh hưởng với thâm nhiễm HIV. Tuy nhiên, khi thâm chuyển tương tự với các tế bào chuột thì HIV có thể gắn được các tế bào biểu hiện CD4, nhưng không vào được bên trong các tế bào này. Phát hiện này chỉ rõ rằng cần phải có một phản ứng thứ hai thì sự thâm nhập mới xảy ra.



Hình 1.9 Các protein đỉnh của retrovirus hình thành nên phức hợp trimer trên bề mặt virion. Khi nhuộm âm bản đã lộ rõ 3 tổ chức cuộn lại trong glycoprotein vỏ các hạt virus có trong nước bọt của người (A; đường kẻ chỉ 50 nm). Protein đỉnh trimer được xếp thành các vòng 6 đỉnh (B; đường kẻ chỉ 25 nm).

(Theo Bruce A. Voyles. *Biology of Viruses*. McGraw-Hill international edition 2002)

Glycoprotein vỏ HIV có tên là SU vì nó định vị trên bề mặt và đáp ứng cho việc gắn CD4. Phân tử lớn này không thể neo trực tiếp được vào màng của vỏ nhưng lại xảy ra nhiều tương tác với các glycoprotein màng hợp nhất nhỏ hơn gọi là TM (vì nó là một chất vận chuyển màng). Trimer của phân tử SU-TM hình thành nên các đỉnh (được kéo ra từ vỏ virus). Vị trí gắn của SU đối với CD4 là một túi bảo vệ để nó không bị tác động bởi kháng thể. Cấu trúc trimer tương tự của các glycoprotein vỏ cũng xuất hiện ở các retrovirus khác.

Bảng 1.3 Các receptor bề mặt dùng để gắn các virus động vật

Họ virus	Virus	Receptor
Piconavirus	Human rhinovirus	Các phân tử kết dính nội bào
Orthomyxovirus	Influenza A	Acid N-acetyl-neuraminic
Paramyxovirus	Sendai	Acid N-acetyl-neuraminic trong các glycolipid
Herpesvirus	Herpes simplex	Heparan sulfate
	Epstein-Bar	Receptor C3d của lympho B
Rhabdovirus	Virus gây bệnh ở miệng (vesicular stomatitis)	Phosphatidylserine
	Rabies	Receptor của neuron acetylcholine
Retrovirus	HIV	CD4

1.6 Các virus động vật vào trong các tế bào vật chủ và sự lột vỏ acid nucleic của chúng

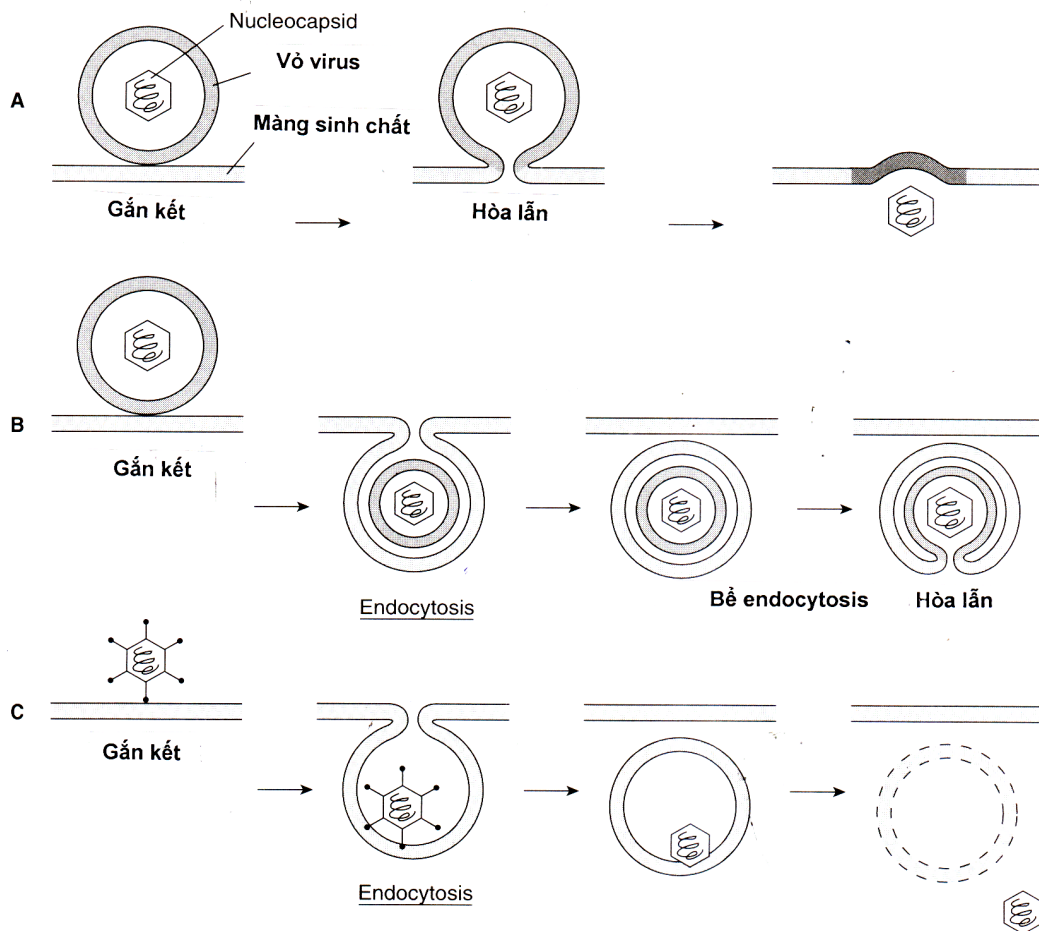
Bề mặt các tế bào động vật là các cấu trúc động trong một dòng chảy liên tục. Việc gắn một virus vào bề mặt động này sẽ tạo ra các dữ kiện dẫn đến việc virus đi vào bên trong các tế bào (thâm nhập) và đưa hệ gen virus vào những bộ phận thích hợp của tế bào – nơi xảy ra sự sao chép (lột vỏ). Có rất nhiều dữ kiện về quá trình thâm nhập và lột vỏ trong các tế bào động vật thu thập được qua các nghiên cứu hiển vi điện tử. Những công trình như thế rất giá trị nhưng cần phải được giải thích cẩn kẽ hơn. Hiệu ứng phủ (plating) có thể là cực kỳ thấp trong các hệ thống virus động vật. Vì vậy có khả năng là các quan sát về sự gắn kết của virion với màng sinh chất hoặc các bóng ở bên trong tế bào chất thực chất là các “kết cục chết” (dead end) hơn là các ví dụ về sự thâm nhiễm hiệu quả. Như đã được đề cập, trong nhiều virus việc gắn vào bề mặt tế bào vật chủ là cần thiết nhưng chưa đủ để tạo được một thâm nhiễm. Sau bước gắn khởi đầu làm cho virion tiếp xúc với bề mặt tế bào thì phải tiếp tới bước thứ hai là phản ứng gắn đặc hiệu với phân tử đồng receptor (coreceptor) để cảm ứng quá trình thâm nhập và lột vỏ. Trong một số trường hợp một virus hoặc nhóm virus có quan hệ gần gũi đều có thể gắn với các receptor biểu lộ những tình huống tế bào khác nhau trên cơ sở sự nhận diện của các đồng receptor khác nhau.

Cơ chế chung của sự thâm nhập và lột vỏ của virus

Các virus động vật sử dụng hai cơ chế chung cho việc thâm nhập và lột vỏ virion của chúng: hòa trực tiếp vỏ virus vào màng sinh chất của tế bào vật chủ và cơ chế tiêu hóa nội bào (*endocytosis*) cảm ứng virus. Những cơ chế này dựa trên cơ sở các quá trình bình thường của một tế bào động vật dùng để chuyển vật chất từ môi trường ngoài vào tế bào chất. Các chất dịch, protein và các hạt nhỏ có thể vào được bên trong tế bào thông qua quá trình tiêu hóa nội bào (*endocytosis*) (*endo* tiếng Hy Lạp là “bên trong” và *cyto* là “bóng” (bể) đóng kín). Đó là một quá trình có liên quan tới sự hòa nhập của màng sinh chất ở dạng một bóng bao các chất liệu ở bên trong. Sự hấp thụ không đặc hiệu của các giọt dịch nhỏ được gọi là uống bào (*pinocytosis*). Ngược lại, *endocytosis* qua trung gian receptor thì vận chuyển các phân tử đặc biệt hoặc các hạt đã gắn vào các receptor bề mặt tế bào. Những receptor này thường định vị cạnh các vùng chuyên hóa của màng gọi là các “hầm bao phủ” (coated pits). Cả *pinocytosis* và *endocytosis* qua trung gian receptor thì màng sinh chất tạo nên một chỗ lõm và dần dần càng sâu hơn cho tới khi hình thành nên một bóng do sự hòa màng ở bề mặt tế bào. Các bơm proton trong màng bóng sau đó sẽ vận chuyển ion H^+ vào trong bóng khi pH thấp. Bóng nội bào cũng có thể hòa với màng của nó bởi lysosome – một bóng có chứa nhiều enzyme phân giải chỉ hoạt động ở pH thấp, thấy trong các bóng lai (hybrid vesicle).

Các virus động vật tận dụng khả năng của màng để hòa với một màng khác tạo nên các bóng bên trong tế bào chất. Các virus có vỏ có thể thâm nhập vào các tế bào vật chủ của chúng và bắt đầu quá trình lột vỏ bằng cách gắn vào các phân tử receptor màng sinh chất. Sau đó hòa trực tiếp màng vỏ của chúng với màng sinh chất tế bào vật chủ (Hình 1.10). Khi vỏ và màng sinh chất tế bào vật chủ đã hòa vào nhau thì nucleocapsid sẽ được chuyển vào tế bào chất của vật chủ. Cách khác để các virus có vỏ có thể thâm nhập vào tế bào vật chủ là *endocytosis*. Khi gắn vỏ virus với các receptor màng bề mặt tế bào đặc hiệu sẽ gây nên *endocytosis* ở vùng màng sinh chất (Hình 1.10). Khi pH trong bóng giảm xuống thì vỏ virus sau đó có thể hòa được với màng của bóng để chuyển nucleocapsid tới tế bào chất.

Các virus trần hiển nhiên là không thể vào trong các tế bào vật chủ bằng cách hòa màng trực tiếp, vì thế chúng chỉ có thể thâm nhập tế bào vật chủ bằng endocytosis. Thuật ngữ *viropexis* (*pexis* tiếng Hy Lạp là “sự cố định”) đã được áp dụng cho endocytosis của các virus trần cảm ứng bởi việc gắn kết (sự cố định) của chúng với bề mặt tế bào vật chủ (Hình 1.10). Các nghiên cứu sớm hơn đã chứng minh rằng, một số virus trần như poliovirus vào trong các tế bào vật chủ thông qua một quá trình gọi là thâm nhập “trực tiếp” trong đó virion gắn vào màng sinh chất và bị phân giải, nhờ vậy mà nucleocapsid được chuyển vào bên trong tế bào chất. Tuy nhiên, các dẫn liệu hiện đại lại không ủng hộ cho cơ chế này.



Hình 1.10 Các mô hình thâm nhập của virus động vật. A, tiến vào bằng cách hòa trực tiếp vỏ và màng sinh chất. B, tiến vào bằng endocytosis qua trung gian receptor, sau đó bằng hòa vỏ và màng bóng. C, sự tiến vào của các virus trần bằng endocytosis qua trung gian receptor, sau đó phá vỡ bóng để giải phóng các nucleocapsid của virus.

(Theo Bruce A. Voyles. *Biology of Viruses*. McGraw-Hill international edition 2002)

Liên quan tới quá trình thâm nhập là sự lột vỏ (uncoating). Đây là một quá trình rất đáng quan tâm vì nó bao hàm tất cả các dữ kiện xảy ra giữa việc virion vào trong các tế bào vật chủ và bắt đầu biểu hiện hệ gen virus. Sự lột vỏ bao hàm cả việc dịch chuyển hoặc sắp xếp lại các protein capsid và việc làm mất các đỉnh cho phép hệ gen sử dụng bộ máy của tế bào cho các hoạt động của Central Dogma. Những sự kiện thường xảy ra này dường như là kết quả trực tiếp của một quá trình cho phép virus vào được bên trong các tế bào vật chủ của nó, mặc dầu cần phải có các bước hỗ trợ. Dĩ nhiên sự lột vỏ hay vận chuyển hệ gen tới các vị trí để biểu hiện đều là những sự kiện trong chu kỳ sao chép của virus.

PHỤ LỤC II

NHỮNG KHÁI NIỆM CƠ BẢN VỀ TẾ BÀO GỐC VÀ NHỮNG ỨNG DỤNG CỦA CHÚNG TRONG GEN TRỊ LIỆU

2.1 Mở đầu

Tế bào gốc có tiềm năng rất lớn phát triển thành các dạng tế bào khác nhau trong cơ thể. Hoạt động với tư cách là một hệ thống sửa chữa của cơ thể, về lý thuyết các tế bào này có thể được phân chia không giới hạn để cung cấp thêm các loại tế bào khác nhau cũng như kéo dài đời sống của người và động vật. Khi một tế bào gốc được phân chia thì mỗi tế bào mới đều có tiềm năng duy trì là một tế bào gốc hoặc trở thành các dạng tế bào khác với các chức năng chuyên hóa như tế bào cơ, hồng cầu hay tế bào của não bộ.

Các nghiên cứu về tế bào gốc đang được phát triển nhằm cung cấp các tri thức về sự phát triển của cơ thể từ một tế bào đơn cũng như các tế bào khỏe mạnh sẽ được thay thế cho các tế bào đã bị hủy hoại trong cơ thể trưởng thành như thế nào. Lĩnh vực khoa học đầy hứa hẹn này cũng khích lệ các nhà khoa học khám phá ra những khả năng của trị liệu với cơ sở tế bào đối với các bệnh thường liên quan tới **y học tái sinh** hoặc **y học sửa chữa**.

Tế bào gốc là một trong những lĩnh vực quyến rũ nhất của sinh học hiện nay. Các công trình khoa học đang được tiến hành khẩn trương để phát hiện mới về tế bào gốc. Viện sức khỏe quốc gia Hoa Kỳ (NIH) đã tóm tắt những vấn đề này dưới dạng câu hỏi để độc giả có tiếp thu vấn đề một cách đơn giản và dễ hiểu như sau:

2.2 Thế nào là tế bào gốc và tầm quan trọng của chúng như thế nào?

Các tế bào gốc có hai đặc trưng quan trọng phân biệt chúng với các dạng tế bào khác. Thứ nhất, chúng là các tế bào không chuyên hóa, chúng tự hồi phục trong một thời gian dài thông qua sự phân chia tế bào. Thứ hai, dưới các điều kiện sinh lý học và thực nghiệm thì chúng có thể bị cảm ứng để trở thành các tế bào với các chức năng như các tế bào đập (beating) của tim hoặc các tế bào sản xuất insulin của tụy v.v..

Các nhà khoa học đã nghiên cứu bước đầu về hai loại tế bào gốc từ động vật và người.

Điều trị bệnh Parkinson bằng các tế bào gốc trong tương lai

Parkinson là một bệnh thoái hóa thần kinh rất thường gặp, nó tác động tới trên 2% quần thể những người trên 65 tuổi. Bệnh Parkinson gây nên bởi sự thoái hóa tiến triển và làm mất đi các neuron sản xuất dopamine dẫn đến run rẩy, co cứng và giảm chức năng vận động (sự di chuyển bị suy giảm một cách bất thường). Parkinson có thể là một bệnh đầu

tiên được thử nghiệm với các tế bào gốc của phôi và các tế bào gốc trưởng thành, những tế bào này có chức năng và các đặc trưng khác nhau. Từ 20 năm trước đây các nhà khoa học đã phát hiện ra các cách để thu nhận hoặc truy gốc các tế bào gốc của phôi chuột. Qua nhiều năm nghiên cứu chi tiết về sinh học các tế bào gốc của chuột đã dẫn đến sự phát hiện năm 1998 về cách phân lập các tế bào gốc của phôi người và cho nó phát triển trong phòng thí nghiệm. Những tế bào này được gọi là **tế bào gốc phôi của người** (human embryonic stem cells). Những phôi được sử dụng trong nghiên cứu này được tạo ra trong các nghiên cứu về thụ tinh *in vitro* (*in vitro* fertilization) và khi không cần dùng cho mục đích này nữa thì chúng sẽ được tặng lại để nghiên cứu với sự đồng ý của người cho.

Các tế bào gốc rất quan trọng đối với cơ thể sống vì nhiều lý do. Phôi ở 3-5 ngày tuổi gọi là túi phôi (blastocyst), các tế bào gốc trong các mô đang phát triển sẽ sinh ra nhiều dạng tế bào chuyên hóa để tạo nên tim, phổi, da và các mô khác. Trong một số mô trưởng thành như tủy xương, cơ, não bộ, thì các quần thể riêng biệt của các tế bào gốc cũng được tạo ra để thay thế cho các tế bào đã bị mất mát do các sinh hoạt thường ngày, do chấn thương hay do bệnh tật.

Người ta đã dùng phương pháp cấy ghép tế bào gốc để điều trị bệnh. Ngoài ra, một số phòng thí nghiệm cũng đã thành công trong việc phát triển các phương pháp để cảm ứng các tế bào gốc của phôi để biệt hóa thành nhiều tế bào có các chức năng của neuron dopamine (DA).

Trong một nghiên cứu gần đây các nhà khoa học đã trực tiếp biệt hóa các tế bào gốc của phôi chuột thành các neuron DA bằng cách đưa vào một gen có tên là *Nurr1*. Khi được cấy ghép vào não chuột với mô hình Parkinson thì những tế bào gốc từ các neuron DA này kích thích trở lại não bộ chuột, giải phóng dopamine và cải thiện chức năng vận động. Về vấn đề trị liệu bằng tế bào gốc người, các nhà khoa học đang phát triển nhiều chiến lược sản xuất các neuron dopamine từ tế bào gốc của người trong phòng thí nghiệm để truyền cho những người mắc bệnh Parkinson. Lợi thế của việc có thể cung cấp một cách không hạn chế các neuron dopamine sẽ mở ra khả năng lớn đối với việc ghép neuron cho các bệnh nhân Parkinson trong tương lai.

Các nhà khoa học đã đưa ra giả thuyết cho rằng các tế bào gốc trong tương lai sẽ là cơ sở của việc điều trị các bệnh như Parkinson, bệnh tiểu đường và các bệnh tim.

Các nhà khoa học muốn nghiên cứu các tế bào gốc trong phòng thí nghiệm vì họ muốn biết các đặc tính đặc biệt của chúng và cái đã tạo nên những sự khác biệt giữa các dạng tế bào chuyên hóa. Các tế bào gốc chẳng những có khả năng được dùng trong các trị liệu với cơ sở tế bào mà còn dùng để sàng lọc các thuốc mới và các độc tố cũng như tìm hiểu các khuyết tật khi sinh. Tuy nhiên, như đã đề cập ở trên các tế bào gốc của phôi người mới chỉ được nghiên cứu từ năm 1998. Vì thế để phát triển những cách điều trị như thế các nhà khoa học cần phải nghiên cứu rộng hơn về các đặc trưng cơ bản của tế bào gốc bao gồm:

1. Xác định chính xác thời gian các tế bào gốc còn duy trì được tính không đặc hiệu và sự tự phục hồi.
2. Phân biệt được các tín hiệu làm cho các tế bào gốc trở thành các tế bào chuyên hóa.

2.3 Những đặc tính độc quyền của tất cả các tế bào gốc

Các tế bào gốc khác với các loại tế bào khác của cơ thể. Tất cả các tế bào gốc, bất chấp nguồn gốc của chúng ở đâu đều có 3 đặc trưng chung như sau: có khả năng phân chia và tự phục hồi trong một thời gian dài; không chuyên hóa và chúng có khả năng nảy sinh ra các tế bào chuyên hóa.

Các nhà khoa học đang cố gắng tìm hiểu các đặc tính cơ bản của các tế bào gốc liên quan tới sự tự phục hồi của chúng:

1. Tại sao các tế bào gốc của phôi có thể tăng sinh hàng năm và lâu hơn nữa trong phòng thí nghiệm mà không biệt hóa, nhưng các tế bào gốc trưởng thành thì không có khả năng này và
2. Những yếu tố nào trong cơ thể sống điều hòa một cách bình thường sự tăng sinh và sự tự phục hồi của các tế bào gốc?

Trả lời được những câu hỏi này thì sẽ hiểu được sự tăng sinh tế bào được điều hòa như thế nào trong sự phát triển bình thường hoặc trong sự phân chia tế bào bất thường dẫn đến ung thư. Điều quan trọng là những thông tin này sẽ cho phép các nhà khoa học nâng cao hơn nữa hiệu ứng của các tế bào gốc của phôi và tế bào gốc trưởng thành trong phòng thí nghiệm.

2.3.1 Các tế bào gốc không chuyên hóa

Một trong những đặc trưng cơ bản của một tế bào gốc là nó không có bất kỳ cấu trúc đặc hiệu mô nào để cho phép nó thể hiện các chức năng chuyên hóa. Một tế bào gốc không thể làm việc với tế bào bên cạnh để bơm máu đi khắp cơ thể (giống như một tế bào cơ tim); nó cũng không có khả năng mang oxy tới các mạch máu (giống như một tế bào hồng cầu) và nó cũng không thể phóng các tín hiệu điện tới các tế bào khác để cho phép cơ thể di chuyển hay nói năng (giống như một tế bào thần kinh). Tuy nhiên, các tế bào gốc không chuyên hóa cũng có thể sản sinh ra các tế bào chuyên hóa như tế bào cơ, tế bào máu và tế bào thần kinh.

2.3.2 Các tế bào gốc có khả năng phân chia và tự hồi phục dài hạn

Không giống như các tế bào cơ, tế bào máu hoặc tế bào thần kinh – những tế bào này không có khả năng sao chép một cách bình thường. Ngược lại, các tế bào gốc có thể sao chép được nhiều lần. Khi các tế bào tự sao chép được nhiều lần thì gọi là ***sự tăng sinh***. Khi cho các quần thể tế bào gốc tăng sinh trong nhiều tháng ở phòng thí nghiệm thì có thể thu được hàng triệu tế bào gốc. Nếu kết quả thu được vẫn là các tế bào không biệt hóa giống như các tế bào bố mẹ thì có thể nói được là các tế bào này có khả năng tự phục hồi dài hạn.

Các yếu tố và các điều kiện cho phép các tế bào gốc duy trì được sự không chuyên hóa được các nhà khoa học quan tâm rất nhiều. Tất nhiên các nhà khoa học đã tốn rất nhiều năm thử nghiệm và chắc chắn cũng không tránh khỏi những lỗi lầm trong khi đi tìm các phương pháp để phát triển các tế bào gốc trong phòng thí nghiệm để chúng không tự động biệt hóa thành các dạng tế bào đặc biệt. Chẳng hạn như người ta đã mất 20 năm tìm hiểu cách phát triển các tế bào gốc phôi người trong phòng thí nghiệm để tìm ra các điều kiện cho việc phát triển các tế bào gốc của chuột. Vì thế vấn đề quan trọng của các nghiên cứu là phải biết được các tín hiệu trong một cơ thể trưởng thành làm cho một

quần thể tế bào gốc tăng sinh và duy trì được tính không chuyên hóa cho đến tận khi cần các tế bào này để sửa chữa một mô đặc hiệu. Những thông tin như thế rất quan trọng để các nhà khoa học có thể phát triển được một số lượng lớn các tế bào gốc trong phòng thí nghiệm trong tương lai.

2.3.3 Các tế bào gốc có thể sản sinh ra các tế bào chuyên hóa

Quá trình một tế bào gốc không chuyên hóa sản sinh ra các tế bào chuyên hóa được gọi là **sự chuyên hóa**. Các nhà khoa học cũng vừa mới biết các tín hiệu bên trong và bên ngoài tế bào để phát sinh sự biệt hóa tế bào gốc. Các tín hiệu bên trong được kiểm soát bởi các gen của tế bào nằm trong các chuỗi DNA. Các tín hiệu bên ngoài cho sự biệt hóa tế bào bao gồm các chất hóa học được tiết ra bởi các tế bào khác, các tiếp xúc vật lý với các tế bào bên cạnh và các phân tử xác định trong **vi môi trường** (microenvironment).

Vì thế, vẫn còn nhiều vấn đề tồn tại về sự biệt hóa tế bào gốc. Ví dụ như liệu các tín hiệu bên trong và bên ngoài của sự biệt hóa tế bào ở tất cả các loại tế bào gốc có giống nhau không? Và liệu có xác định được những tín hiệu đặc hiệu thúc đẩy sự phân hóa thành các dạng tế bào đặc biệt hay không? Nếu trả lời được những câu hỏi này sẽ giúp cho các nhà khoa học tìm được những phương pháp mới kiểm soát sự biệt hóa tế bào gốc trong phòng thí nghiệm, do đó có thể sử dụng được cho các mục đích đặc biệt như việc trị liệu dựa trên cơ sở tế bào.

Các tế bào gốc trưởng thành sản sinh ra các dạng tế bào của chính mô đó. Chẳng hạn như các tế bào gốc trưởng thành tạo máu ở tủy xương sẽ sản sinh ra nhiều dạng tế bào máu như hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu. Mới gần đây người ta vẫn nghĩ rằng các tế bào tạo máu trong tủy xương được gọi là các tế bào gốc tạo máu (hematopoietic stem cell) không thể tạo được các tế bào của nhiều mô khác như các tế bào thần kinh ở não bộ. Tuy nhiên, nhiều thực nghiệm trong những năm qua đã chứng minh rằng các tế bào gốc có thể sản sinh ra các dạng tế bào của một mô khác biệt hoàn toàn, hiện tượng đó được hiểu là **tính mềm dẻo** (plasticity). Những ví dụ về tính mềm dẻo như các tế bào máu có thể trở thành các neuron hay các tế bào gan có thể sản xuất được insulin và các tế bào gốc tạo máu có thể thành các tế bào cơ tim. Vì thế việc khám phá ra các khả năng của việc sử dụng các tế bào gốc trưởng thành trở thành điểm nóng đối với các nhà khoa học.

2.4 Các tế bào gốc của phôi

2.4.1 Các giai đoạn phát triển sớm giữ vai trò quan trọng trong việc sản sinh các tế bào gốc

Các tế bào gốc của phôi như tên gọi của chúng, được xuất phát từ phôi. Đặc biệt là các tế bào gốc của phôi được phát triển từ trứng thụ tinh *in vitro* – tức là thụ tinh lâm sàng *in vitro* (*in vitro fertilization clinic*) sau đó được tặng cho các mục đích nghiên cứu với sự đồng ý của người cho. Cần phải nhấn mạnh thêm rằng những phôi này không phải từ trứng được thụ tinh trong cơ thể người mẹ. Các tế bào gốc của phôi người 4-5 ngày tuổi là một khối cầu rỗng gọi là **túi phôi**. Túi phôi gồm 3 cấu trúc: **lá phôi** (trophoblast) là một lớp tế bào mỏng bao quanh túi phôi. **Khoang phôi nang** (blastocoel) là một hốc rỗng ở bên trong túi phôi và **một khối tế bào bên trong** – đó là một nhóm khoảng 30 tế bào ở một đầu của khoang phôi nang.

2.4.2 Phát triển các tế bào gốc của phôi trong phòng thí nghiệm

Phát triển các tế bào gốc trong phòng thí nghiệm tức là sự nuôi cấy tế bào. Các tế bào gốc phôi người được phân lập bằng cách chuyển khối tế bào bên trong sang một đĩa nhựa nuôi cấy của phòng thí nghiệm, bên trong có chứa các chất dinh dưỡng gọi là môi trường nuôi cấy. Các tế bào này được phân chia và trải rộng trên mặt đĩa. Mặt trong của đĩa nuôi cấy được bao đặc biệt với các tế bào da phôi chuột đã được xử lý để chúng không phân chia được nữa. Lớp tế bào bọc này gọi là lớp feeder- lớp nuôi dưỡng (feeder layer). Lý do của việc có các tế bào chuột ở đáy đĩa nuôi cấy là để các tế bào ở khối bên trong gắn được vào các bề mặt cần gắn. Các tế bào nuôi dưỡng còn giải phóng các chất dinh dưỡng vào trong môi trường nuôi cấy. Gần đây, các nhà khoa học đã bắt đầu sáng chế ra các phương pháp phát triển các tế bào gốc mà không cần các tế bào nuôi dưỡng. Đây là một tiến bộ rất có ý nghĩa bởi vì các virus hoặc các đại phân tử khác của chuột có thể được truyền vào các tế bào của người.

Sau liệu trình khoảng vài ngày, các tế bào của khối bên trong sẽ tăng sinh và bắt đầu tập trung đông đúc trên đĩa nuôi cấy. Khi đó chúng được lấy ra một cách nhẹ nhàng và đặt vào một vài đĩa nuôi cấy tươi. Quá trình này được lặp đi lặp lại nhiều tháng và được gọi là **tiểu nuôi cấy** (subculturing). Mỗi chu kỳ tiểu nuôi cấy tế bào được gọi là một **lượt qua** (passage). Sau 6 tháng hoặc hơn, từ 30 tế bào gốc của khối tế bào bên trong sẽ cho ra hàng triệu tế bào gốc của phôi. Các tế bào gốc của phôi được tăng sinh trong môi trường nuôi cấy 6 tháng hoặc lâu hơn nữa mà không có sự biệt hóa thì chúng là các tế bào đa năng (pluripotent) đó là sự hoạt động gen bình thường dòng tế bào gốc của phôi. Khi các dòng tế bào đã được thiết lập hoặc thậm chí ngay cả trước đó, những tế bào này có thể được làm đông khô để gửi tới các phòng thí nghiệm khác để tiến hành việc nuôi cấy và làm các thực nghiệm tiếp theo.

2.4.3 Những test trong phòng thí nghiệm để xác định các tế bào gốc của phôi

Tại các thời điểm khác nhau trong quá trình sản xuất các dòng tế bào gốc của phôi, các nhà khoa học phải làm test các tế bào để xem chúng có bộc lộ những đặc tính cơ bản là các tế bào gốc của phôi hay không. Quá trình này gọi là **xác định các đặc trưng** (characterization).

Cho đến nay, các nhà khoa học tế bào gốc phôi người vẫn chưa nhất trí các tiêu chuẩn test để xác định các đặc trưng cơ bản của tế bào. Các nhà khoa học cũng ghi nhận rằng nhiều test họ sử dụng có thể chưa là các chỉ thị tốt cho các đặc trưng và chức năng sinh học quan trọng nhất của tế bào.

Những test cần thiết phải tiến hành bao gồm:

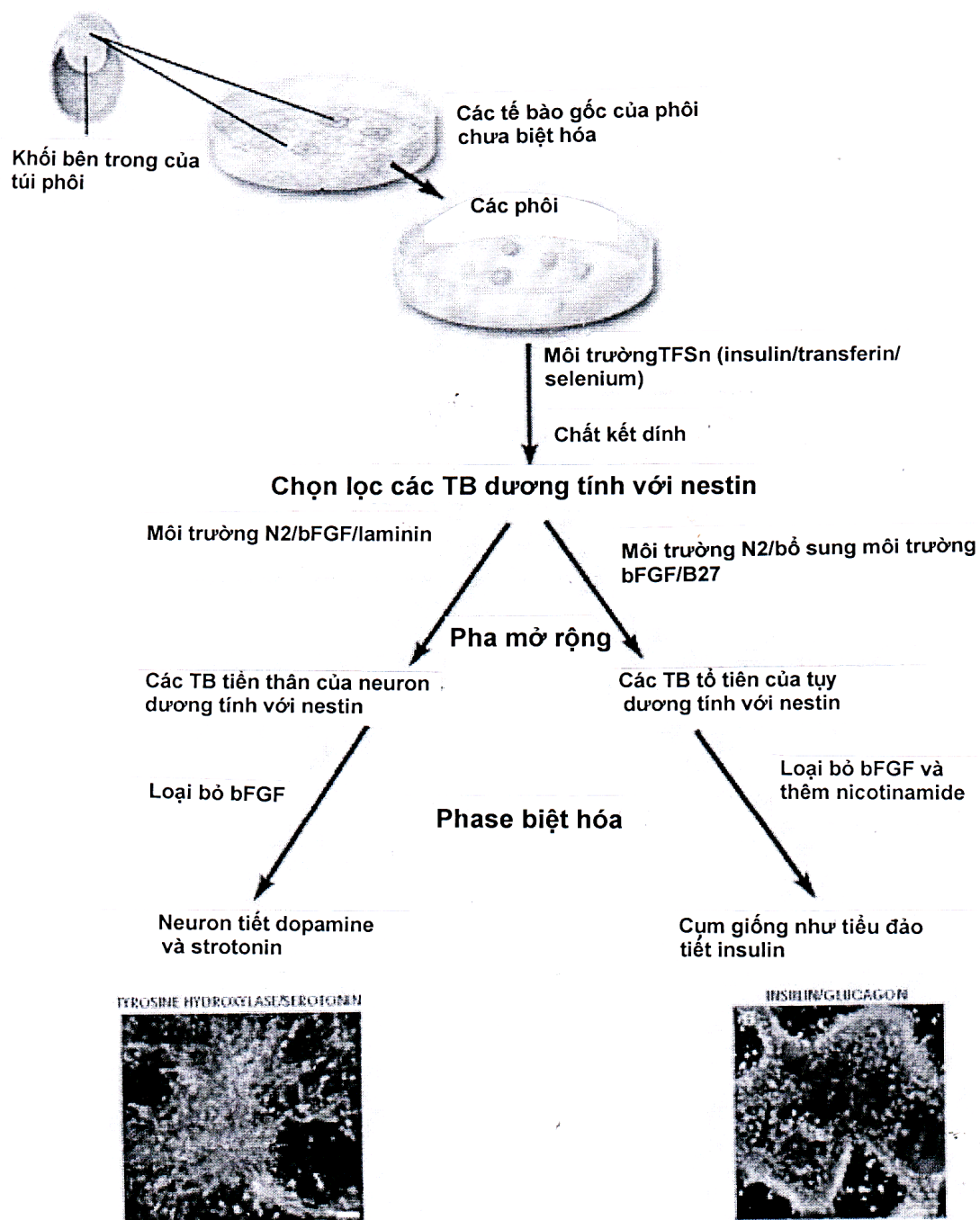
1. Phát triển và tiểu nuôi cấy các tế bào gốc trong nhiều tháng. Điều này đảm bảo rằng các tế bào có khả năng tự phục hồi dài hạn. Các nhà khoa học sẽ phải xem xét kỹ việc nuôi cấy qua kính hiển vi để xem các tế bào đó có khỏe không và còn duy trì được trạng thái chưa biệt hóa không.
2. Dùng các kỹ thuật đặc biệt để xác định sự có mặt các dấu chuẩn bề mặt chỉ có ở các tế bào chưa biệt hóa. Một test quan trọng khác là sự hiện diện của một protein có tên là Oct-4 – đó là một chất đặc biệt làm cho các tế bào không biệt

hóa. Oct-4 là một yếu tố phiên mã, tức là nó giúp cho sự mở và đóng gen đúng thời điểm, đó là một bộ phận quan trọng trong sự biệt hóa tế bào và phát triển phôi.

3. Kiểm tra NST dưới kính hiển vi. Đây là một phương pháp xác định xem NST có bị hư hỏng không hoặc số NST có biến đổi không. Tuy nhiên, nó không phát hiện được những đột biến gen ở các tế bào này.
4. Xác định các tiểu nuôi cấy sau khi bị làm đông khô, làm tan và chuyển lên đĩa.
5. Làm test các tế bào gốc phôi xem chúng có đa năng hay không, quá trình này gồm các bước như sau: 1) cho tế bào biệt hóa tự động trong nuôi cấy tế bào; 2) thực hiện các thao tác tế bào để cho chúng biệt hóa thành các dạng tế bào đặc biệt; hoặc 3) tiêm các tế bào vào chuột đã được kiểm chế miễn dịch để test về sự hình thành các khối u lành tính gọi là u quái (teratoma). Đặc trưng của teratoma là chứa hỗn hợp nhiều dạng tế bào đã biệt hóa hoặc biệt hóa một phần – một chỉ thị về khả năng của các tế bào gốc là có thể biệt hóa thành nhiều dạng tế bào.

2.4.4 Kích thích sự biệt hóa các tế bào gốc của phôi

Các tế bào gốc của phôi vẫn được phát triển trong nuôi cấy miễn là trong các điều kiện xác định chúng vẫn chưa biệt hóa. Nhưng nếu các tế bào này được phép cụm lại với nhau thành các thể phôi (embryoid bodies) thì chúng sẽ bắt đầu tự động biệt hóa. Chúng có thể tạo nên các tế bào cơ, tế bào thần kinh và nhiều dạng tế bào khác nữa. Mặc dầu sự biệt hóa tự động là một chỉ thị về sự khỏe mạnh của các tế bào gốc được nuôi cấy, nhưng nó không phải là cách hiệu lực để tạo ra các dạng tế bào đặc hiệu bằng nuôi cấy. Vì vậy, để tạo ra các tế bào đặc hiệu của các tế bào biệt hóa bằng nuôi cấy như tế bào cơ tim, các tế bào máu hoặc các tế bào thần kinh thì các nhà khoa học phải cố gắng kiểm soát được quá trình biệt hóa của các tế bào gốc của phôi. Để thực hiện điều đó các nhà khoa học đã thay đổi các thành phần hóa học của môi trường nuôi cấy, thay đổi bề mặt đĩa nuôi cấy hoặc cải biến các tế bào bằng cách cài vào các gen đặc hiệu. Trải qua nhiều năm thực nghiệm các nhà khoa học đã thiết lập được một số quy trình cơ bản hay là các “công thức” (recip) cho sự biệt hóa trực tiếp các tế bào gốc của phôi thành một số dạng tế bào đặc biệt (Hình 20.1). Nếu các nhà khoa học thực sự đã trực tiếp biến hóa các tế bào gốc của phôi thành các tế bào đặc biệt thì họ cũng có khả năng sử dụng những kết quả này để điều trị bệnh trong tương lai. Rất có thể trong thời gian rất gần người ta có thể ứng dụng việc cấy ghép các tế bào đã công nghệ hóa từ tế bào gốc để điều trị các bệnh Parkinson, bệnh tiểu đường, bệnh chấn thương tủy sống, bệnh do thoái hóa tế bào Purkinje, bệnh teo cơ Duchenne, bệnh tim và các bệnh mù và điếc.



Hình2. 1. Sự biệt hóa trực tiếp của các tế bào gốc phôi chuột.

2.5 Các tế bào gốc trưởng thành

Tế bào gốc trưởng thành là các tế bào chưa biệt hóa thấy trong các tế bào đã biệt hóa trong một mô hoặc một cơ quan, nó có khả năng tự hồi phục và có thể biệt hóa thành các dạng tế bào chuyên hóa chính của mô hoặc cơ quan. Vai trò chủ yếu của tế bào gốc

trưởng thành (TBGTT) trong một cơ thể sống là duy trì và sửa chữa mô. Một số nhà khoa học hiện nay dùng thuật ngữ **tế bào gốc sinh dưỡng** (somatic stem cell) thay cho tế bào gốc trưởng thành. Không giống các tế bào gốc của phôi, chúng được định nghĩa theo nguồn gốc của chúng (khối tế bào bên trong của túi phôi). Nguồn gốc của các TBGTT ở tại các mô trưởng thành vẫn chưa được rõ.

Việc nghiên cứu các TBGTT gần đây được khích lệ rất lớn. Các nhà khoa học đã tìm thấy các TBGTT có trong nhiều mô hơn là số mô mà họ nghĩ. Phát hiện này làm cho các nhà khoa học đặt câu hỏi liệu các TBGTT có thể dùng cho việc cấy ghép hay không? Trên thực tế, các tế bào gốc tạo máu trưởng thành từ tủy xương đã được nuôi cấy từ 30 năm nay. Một số loại xác định của TBGTT dường như là có khả năng biệt hóa thành nhiều dạng tế bào khác nhau trong những điều kiện thích hợp. Nếu sự biệt hóa của các TBGTT được kiểm soát trong phòng thí nghiệm (PTN) thì chúng sẽ trở thành cơ sở cho việc trị liệu nhiều bệnh nghiêm trọng thường thấy.

Lịch sử của việc nghiên cứu các tế bào gốc đã được bắt đầu khoảng 40 năm trước đây. Trong những năm 1960, các nhà khoa học đã phát hiện rằng tủy xương có chứa ít nhất 2 loại tế bào gốc. Một quần thể gọi là tế bào gốc tạo máu tạo nên tất cả các dạng tế bào máu trong cơ thể. Quần thể thứ hai là các tế bào đệm tủy xương (bone marrow stromal cell) mới được phát hiện vài năm nay. Các tế bào đệm là một quần thể hỗn hợp các tế bào của cơ thể tạo ra xương, sụn, mỡ và mô liên kết sợi.

Cũng trong những năm 1960, các nhà khoa học đã nghiên cứu trên chuột phát hiện được 2 vùng não bộ có chứa các tế bào đang phân chia, chúng sẽ trở thành các tế bào thần kinh. Mặc dầu đã có những thông báo như vậy nhưng nhiều nhà khoa học vẫn tin rằng các tế bào thần kinh mới này có thể không được tạo ra trong não trưởng thành. Cho đến tận những năm 1990 các nhà khoa học mới đồng ý rằng não trưởng thành có chứa các tế bào gốc có khả năng tạo ra 3 loại tế bào gốc chính, đó là các tế bào hình sao và các tế bào thần kinh đệm ít gai – (chúng không phải là các tế bào neuron) và các neuron hoặc các tế bào thần kinh.

2.5.1 Nơi cư trú của các tế bào gốc trưởng thành và những nhiệm vụ của chúng

Tế bào gốc trưởng thành đã được xác định trong nhiều cơ quan và mô. Điểm quan trọng để hiểu về TBGTT là số lượng tế bào gốc trong mỗi mô rất ít. Các tế bào gốc chỉ cư trú ở một vùng đặc biệt của mỗi mô và chúng duy nằm ở trạng thái yên lặng (không phân chia) trong nhiều năm cho đến tận khi xuất hiện bệnh hoặc có sự tổn thương mô thì chúng mới được hoạt hóa.

Các mô trưởng thành có các tế bào gốc là **não, tủy xương, máu ngoại biên, các mạch máu, cơ xương, da và gan**.

Các nhà nghiên cứu ở nhiều PTN đang cố gắng tìm các phương pháp để phát triển các TBGTT bằng nuôi cấy và thao tác chúng để tạo ra các dạng tế bào đặc biệt có thể dùng để điều trị các chấn thương hoặc các bệnh. Một vài ví dụ về tiềm năng trị liệu như thay thế các tế bào sản xuất dopamine trong não của các bệnh nhân Parkinson, phát triển các tế bào sản xuất insulin cho bệnh tiểu đường type I và sửa chữa những hư hại cơ tim sau khi bị bệnh thuộc các tế bào cơ tim.

2.5.2 Các test cần dùng để xác định các tế bào gốc trưởng thành

Các nhà khoa học chưa nhất trí về các tiêu chuẩn được sử dụng để xác định và làm test các tế bào gốc trưởng thành. Tuy nhiên, họ thường dùng một hoặc nhiều hơn trong số 3 phương pháp sau đây: (1) các tế bào từ một động vật sống đem đánh dấu trong nuôi cấy rồi cấy lại vào động vật khác để xác định xem các tế bào này có phục hồi mô gốc của chúng hay không; (2) rút các tế bào từ động vật sống đã được đánh dấu trong nuôi cấy rồi ghép lại vào một động vật khác để xác định xem các tế bào này có tái định cư vào mô gốc của chúng không và (3) phân lập tế bào rồi cho chúng phát triển trong nuôi cấy và thao tác chúng thường bằng cách cho thêm các yếu tố tăng trưởng hoặc đưa thêm vào các gen mới để xác định xem dạng tế bào nào trở thành các dạng tế bào biệt hóa.

Tương tự như vậy, một tế bào gốc trưởng thành đơn cũng có khả năng tạo ra một dòng các tế bào đồng nhất về di truyền (được hiểu như một dòng-clone), sau đó sẽ sinh ra tất cả các dạng tế bào biệt hóa thích hợp cho mô. Các nhà khoa học đang hướng tới việc làm rõ xem liệu một tế bào gốc có thể nảy sinh ra được một dòng tế bào trong nuôi cấy hoặc một quần thể thuần khiết các tế bào gốc có thể tái định cư vào mô sau khi được ghép vào một động vật hay không? Gần đây, nhờ việc thâm nhiễm các tế bào gốc trưởng thành với một virus người ta đã tạo được phương pháp xác định độc quyền mỗi tế bào riêng biệt. Các nhà khoa học cũng có khả năng chứng minh được rằng các dòng tế bào gốc trưởng thành của cá thể có khả năng tái định cư vào các mô bị tổn thương trong các động vật sống.

2.5.3 Những điều đã biết về sự biệt hóa tế bào gốc trưởng thành

Như đã chỉ rõ ở trên, các nhà khoa học đã thông báo rằng các tế bào gốc trưởng thành ở nhiều mô có thể được biệt hóa bình thường thành các dạng tế bào chuyên hóa của mô ở nơi chúng cư trú. Các tế bào gốc trưởng thành cũng bộc lộ khả năng có thể hình thành các dạng tế bào đặc biệt của các mô khác, quá trình này được hiểu là sự **chuyển biệt hóa** (transdifferentiation) hay **tính mềm dẻo** (plasticity).

2.5.3.1 Những cách biệt hóa bình thường của các tế bào gốc trưởng thành

Trong động vật sống, các TBGTT có thể được phân chia trong một thời gian dài và có thể cho ra các dạng tế bào chín (trưởng thành) có hình dáng, cấu trúc và chức năng đặc trưng của một mô đặc hiệu. Dưới đây là các ví dụ về các con đường biệt hóa của các TBGTT (Hình 20.2)

1. Các tế bào gốc tạo máu cho ra tất cả các dạng tế bào máu: hồng cầu, lympho B, lympho T, các tế bào giết tự nhiên (NK), bạch cầu trung tính (neutrophil), bạch cầu kiềm tính (basophil), bạch cầu ưa eosine (eosinophil), bạch cầu đơn nhân, đại thực bào và tiểu cầu.
2. Các tế bào đệm tủy xương (các tế bào của mô giữa) (mesenchymal stem cell) cho ra nhiều dạng tế bào như các tế bào xương (osteocyte), các tế bào sụn (chondrocyte), các tế bào mỡ (adipocyte) và các loại tế bào khác của mô liên kết như gân chằng hạn.

3. Các tế bào gốc ở não cho ra 3 loại tế bào chính: các tế bào thần kinh (các neuron) và 2 loại tế bào không phải là neuron đó là các tế bào hình sao và các tế bào thần kinh đệm ít gai.
4. Các tế bào gốc ngoại biên trong các dòng thuộc đường tiêu hóa nằm ở các hầm sâu cho ra vài loại tế bào như các tế bào hấp thu, các tế bào có chân (goblet), các tế bào Paneth và các tế bào nội tiết của ruột non (enteroendocrine).
5. Các tế bào gốc của da có ở lớp đáy của biểu bì và các nang tóc.
Các tế bào gốc của biểu bì cho ra các tế bào keratine, chúng di cư tới bề mặt của da và tạo nên một lớp bảo vệ. Còn các tế bào gốc của nang có thể cho ra cả nang tóc và biểu bì.

2.5.3.2 Tính mềm dẻo hay sự chuyển biệt hóa của các tế bào gốc trưởng thành

Nhiều thí nghiệm đã chứng minh rằng một số dạng tế bào gốc trưởng thành là đa năng. Khả năng có thể biệt hóa thành nhiều dạng tế bào gọi là tính mềm dẻo hay sự chuyển biệt hóa. Dưới đây là một số ví dụ về tính mềm dẻo của TBGTT đã được thông báo trong vài năm qua.

1. Các tế bào gốc tạo máu có thể biệt hóa thành 3 dạng chính của các tế bào não bộ (neuron, thần kinh đệm ít gai và tế bào hình sao); các tế bào cơ xương, các tế bào cơ tim; và các tế bào gan
2. Các tế bào thần kinh đệm của tủy xương có thể biệt hóa thành các tế bào cơ tim và các tế bào cơ xương.
3. Các tế bào gốc của não có thể biệt hóa thành các tế bào máu và các tế bào cơ xương.

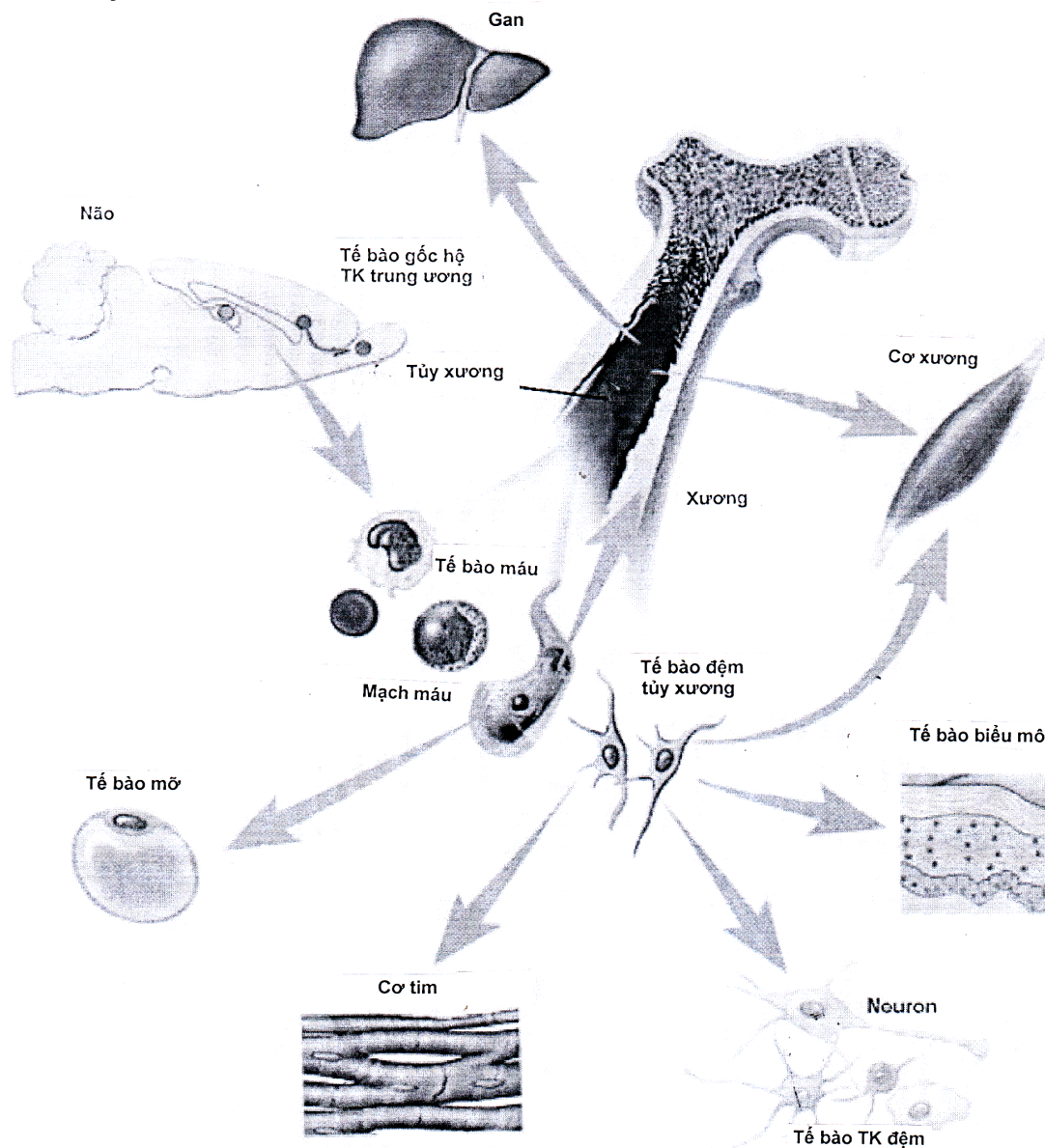
Các nghiên cứu hiện nay đang muốn xác định cơ chế sự mềm dẻo của các TBGTT. Nếu những cơ chế này được xác định và được kiểm soát thì sự hiện diện của các tế bào gốc ở một mô khỏe mạnh có thể được cảm ứng để khôi phục và sửa chữa các mô bệnh (Hình 20.3).

2.5.4 Một số câu hỏi chủ chốt về các tế bào gốc trưởng thành

Có rất nhiều câu hỏi quan trọng về các tế bào gốc trưởng thành cần phải trả lời như:

1. Có mấy loại TBGTT và chúng tồn tại ở những mô nào?
2. Nguồn cung cấp TBGTT trong cơ thể là gì? Chúng có phải là các tế bào gốc của phôi “cặn bã” hay là chúng được nảy sinh bằng các con đường khác? Tại sao chúng vẫn duy trì trạng thái chưa biệt hóa khi mà tất cả các tế bào xung quanh chúng đã biệt hóa?
3. Các TBGTT có biểu hiện một cách bình thường tính mềm dẻo hay chỉ chuyển biệt hóa khi các nhà khoa học thao tác chúng một cách thực nghiệm? Những **tín hiệu** nào điều hòa sự tăng sinh và biệt hóa của các tế bào để chứng minh cho tính mềm dẻo?
4. Có khả năng thao tác các TBGTT để kích thích sự tăng sinh của chúng đến mức có đủ mô để cấy ghép?
5. Một tế bào gốc đơn tồn tại trong tủy xương hay trong tuần hoàn máu có thể tạo ra được các tế bào của một cơ quan hay một mô bất kỳ không?

6. Những yếu tố nào kích thích các tế bào gốc để đổi vào các vị trí bị tổn thương hay bị hủy hoại.



Hình 2.2 Tính mềm dẻo của các tế bào gốc trưởng thành.

2.6 Những điểm giống nhau và khác nhau giữa các tế bào gốc của phôi và tế bào gốc trưởng thành

Các tế bào phôi người và các tế bào gốc trưởng thành đều có những lợi thế và bất lợi về tiềm năng sử dụng cho việc trị liệu thoái hóa với cơ sở tế bào. Dĩ nhiên, các tế bào gốc của phôi và tế bào gốc trưởng thành cũng có những sự khác biệt về số lượng và dạng của tế bào mà chúng có thể được biệt hóa. Các tế bào gốc của phôi có thể trở thành tất

cả các dạng tế bào của cơ thể bởi vì chúng là **đa năng**. Còn các TBGTT thường chỉ biệt hóa một cách giới hạn thành các dạng tế bào khác của mô gốc của chúng. Tuy nhiên, một số bằng chứng cho thấy có thể có sự tồn tại tính mềm dẻo của các TBGTT nên nó có thể làm tăng số lượng các dạng tế bào được hình thành từ tế bào gốc trưởng thành đã cho. Nhiều tế bào gốc của phôi có thể phát triển tương đối dễ dàng bằng nuôi cấy, trong khi đó các TBGTT rất hiếm hoi ở các mô trưởng thành nhưng khi nhân ra bằng nuôi cấy lại không có kết quả. Đây là điểm phân biệt rất quan trọng vì chúng ta đang rất cần một số lượng lớn các tế bào cho việc trị liệu thay thế tế bào gốc.

Một lợi thế tiềm tàng của việc sử dụng các tế bào gốc trưởng thành là các tế bào của các bệnh nhân có thể được nhân lên bằng nuôi cấy sau đó đưa trở lại cho bệnh nhân. Việc sử dụng các tế bào gốc trưởng thành của bệnh nhân có nghĩa là các tế bào này có thể không bị loại thải bởi hệ miễn dịch. Đây là một lợi thế đặc biệt vì khi có loại thải thì bắt buộc lại phải sử dụng các thuốc kiểm chế miễn dịch.

Các tế bào gốc của phôi từ một người cho khi đưa vào một bệnh nhân cũng có thể gặp hiện tượng loại thải mảnh ghép. Tuy nhiên, các thí nghiệm cũng chưa xác định được liệu người nhận ghép có loại thải các tế bào gốc của phôi hay không.

2.7 Tiềm năng của việc sử dụng các tế bào gốc người và những trở ngại cần phải vượt qua trước khi tiềm năng này trở thành hiện thực

Có nhiều cách sử dụng các tế bào gốc người trong các nghiên cứu cơ bản và lâm sàng. Tuy nhiên, những chướng ngại kỹ thuật trong việc hiện thực hóa khả năng sử dụng các tế bào gốc sẽ được vượt qua bằng các nghiên cứu tế bào sâu rộng hơn nữa.

Các nhà nghiên cứu về **tế bào gốc phôi người** có thể cho những thông tin về những sự kiện phức tạp xảy ra trong quá trình phát triển của cơ thể con người. Mục đích cơ bản của công trình này là xác định các tế bào gốc chưa biệt hóa sẽ trở thành biệt hóa như thế nào. Các nhà khoa học hiện nay hiểu rằng việc tắt, mở gen là trung tâm của quá trình này. Một số bệnh nghiêm trọng nhất của y học như ung thư và các bệnh bẩm sinh đều gây nên bởi những bất thường trong **phân chia** và **biệt hóa tế bào**. Để hiểu rõ hơn nữa về sự kiểm soát gen và phân tử của quá trình này thì phải thu lượm được các thông tin về sự nảy sinh của các bệnh này như thế nào và đưa ra các chiến lược mới cho GTL. Trở ngại lớn nhất đối với việc sử dụng các tế bào gốc là người ta chưa hiểu đầy đủ những tín hiệu mở gen đặc hiệu ảnh hưởng tới sự biệt hóa của các tế bào gốc như thế nào.

Các tế bào gốc của người cũng có thể được sử dụng để test các thuốc mới. Chẳng hạn như, các thuốc mới cũng cần phải test về độ an toàn trên các tế bào biệt hóa được sinh ra từ các dạng tế bào gốc đa năng của người. Tuy nhiên, các dòng tế bào khác cũng được sử dụng để làm test, chẳng hạn như các tế bào ung thư được dùng để sàng lọc các thuốc kháng u tiềm tàng. Nhưng các tế bào gốc đa năng thì cho phép test thuốc mới với một thang tế bào rộng hơn. Tuy nhiên, để sàng lọc thuốc một cách hiệu quả thì phải so sánh các thuốc ở các điều kiện thật đồng đều. Vì thế, các nhà khoa học phải kiểm soát được một cách chính xác sự biệt hóa của các tế bào gốc thành các dạng tế bào đặc hiệu trên từng thuốc được test.

Có lẽ khả năng ứng dụng tiềm năng nhất của các tế bào gốc người là sản xuất ra các tế bào và các mô có thể dùng cho các **trị liệu với cơ sở tế bào**. Ngày nay, việc tặng các cơ quan và mô bình thường để thay thế các mô bị đau hoặc đã bị hư hại, tất nhiên phải đặc biệt quan tâm tới khả năng cung ứng của chúng. Các tế bào gốc trực tiếp biệt hóa

thành nhiều dạng tế bào đặc hiệu, đó là nguồn các tế bào và mô thay thế có thể tái định cư được sử dụng để điều trị các bệnh như Parkinson và Alzheimer, tổn thương tủy sống, đột quỵ, bỏng, các bệnh tim, bệnh tiểu đường và bệnh viêm đa khớp dạng thấp. Chẳng hạn như người ta có thể sản sinh được các tế bào cơ tim trong PTN sau đó đem truyền lại các tế bào này cho bệnh nhân tim mạch. Những kết quả bước đầu trên chuột và các động vật khác chỉ rõ rằng các tế bào gốc tủy xương khi được cấy vào tim đã bị hư hại thì chúng có thể tạo ra được các tế bào cơ tim và phục hồi tốt quần thể mô tim. Nhiều nghiên cứu khác gần đây trong các hệ thống nuôi cấy tế bào cũng chỉ rõ rằng có khả năng trực tiếp biệt hóa các tế bào gốc của phôi hoặc các tế bào tủy xương thành các tế bào cơ tim.

Với những người bị tiểu đường type I thì các tế bào tụy sản xuất insulin bình thường đã bị hủy hoại bởi chính hệ miễn dịch của bệnh nhân. Các nghiên cứu mới đây cũng chỉ rõ có khả năng trực tiếp biệt hóa các tế bào gốc phôi người trong nuôi cấy thành các tế bào sản xuất insulin dùng cho các trị liệu cấy ghép bệnh tiểu đường.

Để thực tế hóa phương pháp trị liệu mới với cơ sở tế bào cho các bệnh lan tỏa và làm đối sức bệnh nhân thì các nhà khoa học phải có khả năng thao tác làm tái sinh các tế bào gốc sao cho chúng có được các đặc tính cần thiết cho việc biệt hóa, cấy ghép và nhân giống. Dưới đây là bảng liệt kê các bước cần thiết khi điều trị với cơ sở tế bào. Để phục vụ cho mục đích cấy ghép, các tế bào gốc phải được tái sản xuất để:

1. Tăng sinh mạnh nhằm tạo đủ lượng tế bào cho mô.
2. Biệt hóa thành các dạng tế bào khác.
3. Duy trì sự sống của người nhận sau ghép.
4. Hợp nhất vào xung quanh mô đã cấy ghép.
5. Tạo các chức năng thích hợp để kéo dài cuộc sống của người nhận.
6. Tránh các tác hại có thể cho người nhận.

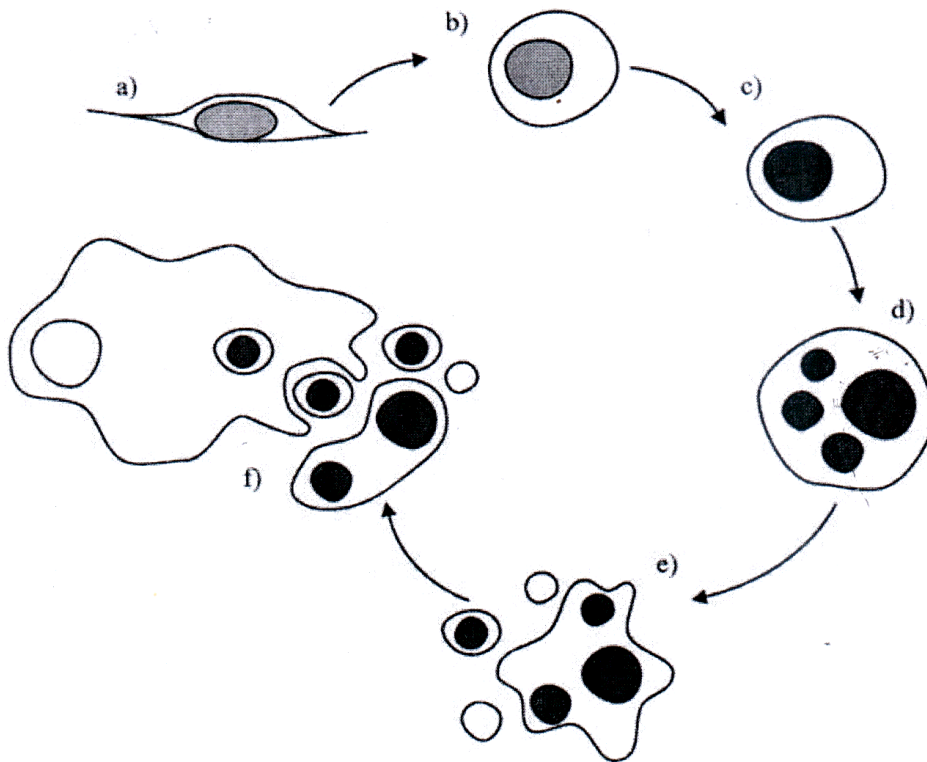
Còn với việc đề phòng loại thải miễn dịch thì các nhà khoa học phải tiến hành nhiều chiến lược nghiên cứu khác nhau để tạo được các mô không bị loại thải.

Tóm lại: trị liệu với các tế bào gốc là một phương pháp đầy hứa hẹn, nhưng các nhà khoa học còn phải vượt qua nhiều chướng ngại về kỹ thuật và cần phải có thêm thời gian nghiên cứu. Nhưng chắc chắn trong tương lai, việc sử dụng các tế bào gốc để trị liệu sẽ cho những kết quả hết sức bất ngờ.

PHỤ LỤC III

SỰ CHẾT THEO CHƯƠNG TRÌNH CỦA TẾ BÀO

Apoptosis (sự chết theo chương trình của tế bào) là một quá trình xảy ra một cách tự nhiên nhờ đó mà tế bào được chết theo một chương trình định sẵn. Tên apoptosis xuất hiện sau các khảo sát trên giun tròn *C.elegans* và theo theo gốc Hy Lạp tức là sự rụng lá. Liệu trình của apoptosis đi kèm với các biến đổi đặc tính hình thái tế bào như ở (Hình 3.1). Cụ thể là chất nhiễm sắc bị ngưng tụ lại, thoái hóa DNA, co tế bào, nhân tế bào bị vỡ và phân rã thành các thể apoptosis ở bên trong màng. Đó là đặc trưng phân biệt giữa apoptosis và các dạng chết khác của tế bào như hoại tử chẳng hạn.



Hình 3.1 Sơ đồ đại diện về những biến đổi hình thái trong một tế bào khi apoptosis. Khi nhận được một tín hiệu apoptosis một tế bào kết dính (a) trở nên tròn (b) và DNA của nhân cô đặc lại (c) DNA bị phân cắt ra thành từng đoạn và nhân bị vỡ thành các thể nhiễm sắc riêng biệt (d). Cuối cùng tế

bào không hợp nhất đi vào một vài bóng (thể apoptosis) (e), đó là sự thực bào bởi các tế bào bên cạnh (f).

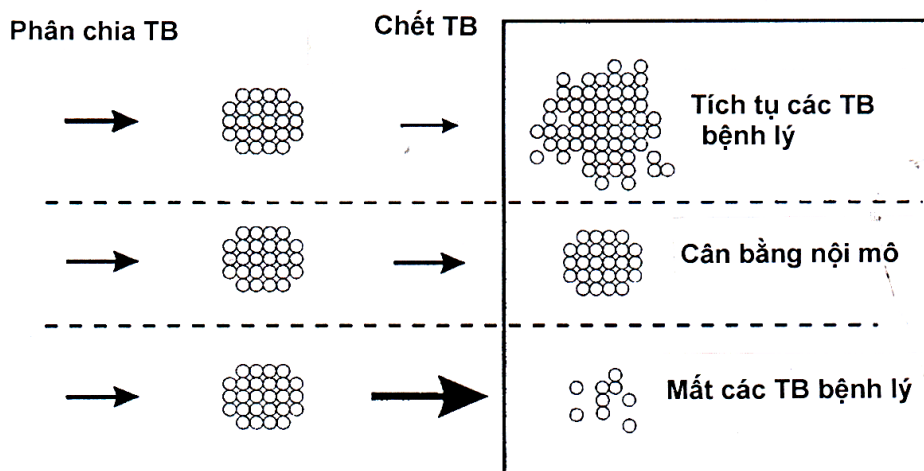
(Theo Gerhard Krauss. *Biochemistry of Signal transduction and regulations*. Wiley-VCG Verlag GmbH 2001)

3.1 Chức năng cơ bản của apoptosis

Apoptosis dựa trên cơ sở chương trình hóa của gen, đó là một bộ phận không thể thiếu được của sự phát triển và tạo chức năng cho cơ thể. Nó có nhiệm vụ loại bỏ các tế bào không mong muốn, các tế bào dư thừa. Tuy nhiên, các trường hợp mà ở đó xảy ra sự hoạt hóa chương trình apoptosis là rất đa dạng.

3.1.1 Sự cân bằng nội mô

Vai trò quan trọng nhất của apoptosis là góp phần vào việc cân bằng nội mô: trong một cơ quan hay một mô thì số lượng tế bào phải giữ hằng định trong các giới hạn hẹp. Nếu số lượng tế bào tăng lên do sự phân chia tế bào thì sẽ được bổ chính bằng quá trình loại bớt các tế bào già và các tế bào đã mất chức năng. Apoptosis là một quá trình nhằm giữ số lượng tế bào trong một mô ở một giới hạn thích hợp cho sự phát triển và thực hiện được các chức năng của cơ thể. Nếu chương trình apoptosis bị khiếm khuyết thì hậu quả có thể là làm tăng hoặc giảm tế bào một cách bệnh lý (Hình 3.2). Chẳng hạn như một số bệnh có liên quan tới sự tăng tỷ lệ sống sót của các tế bào là ung thư và các bệnh tự miễn. Các bệnh liên quan tới tăng apoptosis là AIDS và các bệnh thoái hóa thần kinh (Tompson, 1995).



Hình 3.2 Ảnh hưởng của apoptosis tới sự cân bằng nội mô của tế bào. Trong một cơ thể tăng trưởng, số tế bào trong một mô được xác định bởi mối tương quan giữa tỷ lệ tế bào phân chia và tế bào chết. Tỷ lệ của cả hai quá trình đại diện trên hình vẽ được thể hiện bằng kích cỡ của mũi tên. Ở mô bình thường, số lượng tế bào duy trì ở mức hằng định (cân bằng nội mô), bởi vì cả hai quá trình đều xảy ra với tốc độ như nhau. Nếu tốc độ tăng sinh tế bào tăng cao thì sẽ làm số lượng tế bào tăng (tức là sẽ tạo thành các khối u). Ngược lại, khi tốc độ tế bào chết nổi trội thì sẽ làm số lượng tế bào giảm và cũng là bệnh lý. Khi không có những biến đổi bù trừ trong sự phân chia tế bào

thì những biến đổi của apoptosis có thể dẫn đến sự tích tụ tế bào hoặc mất tế bào (theo Thompson, 1995)

3.1.2 Sự phát triển và biệt hóa

Apoptosis giữ vai trò không thể thiếu được trong các quá trình phát triển và biệt hóa (Vaux và Korsmeyer, 1999) đặc biệt là trong sự phát triển phôi. Ở đây nó được cung cấp các phương tiện để loại bỏ đi các tế bào không cần thiết nữa trong khi tạo hình và tiếp hợp phôi (synaptogenesis).

3.1.3 Chức năng miễn dịch

Trong hệ miễn dịch, chương trình apoptosis được hoạt hóa trong nhiều tình huống như:

- Loại trừ các tế bào đích (các tế bào thâm nhiễm virus) bởi các tế bào lympho T độc tế bào.
- Loại trừ các tế bào lympho B và T phản ứng tự động, loại trừ các tế bào trong tuyến ức (sự chọn lọc tự nhiên): 95% tế bào T di cư tới tuyến ức và đã bị loại trừ bằng apoptosis.

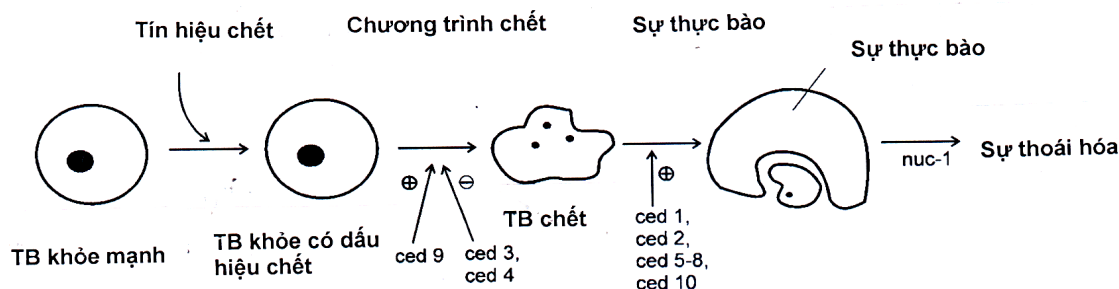
3.1.4 Sự tiêu hủy tế bào

Chức năng khác của apoptosis là tiêu hủy các tế bào đã bị hư hại. Chương trình apoptosis có thể được hoạt hóa khi có sự hủy hoại tế bào hoặc khi bị stress (Evan và Littlewood, 1998). Các tế bào có DNA bị hư hại có thể bị loại trừ với sự giúp đỡ của chương trình apoptosis trước khi chúng có thời cơ tích tụ thành đột biến và các tế bào khối u cũng có thể bị phân hủy bởi apoptosis.

3.2 Apoptosis ở giun tròn *Caenorhabditis elegans*

Mô tả về sự chết theo chương trình của tế bào bắt nguồn từ các quan sát trên giun tròn *Caenorhabditis elegans*. Trong liệu trình phát triển của *C.elegans* với tổng số 1090 tế bào được hình thành thì có 131 tế bào bị loại bỏ với bản chất apoptosis. Quá trình apoptosis liên quan ít nhất tới 14 gen khác nhau, chúng giữ vai trò đặc biệt trong việc điều hòa và thể hiện apoptosis (Steller, 1995; Hình 3.3).

Hai nhóm gen có vai trò quan trọng đặc biệt là gen *ced3* và *ced4* có hiệu ứng tiền apoptosis, tức là đóng vai trò thúc đẩy apoptosis. Cả hai gen này đều cần cho apoptosis của *C.elegans*. Các đột biến ở gen *ced3* và *ced4* sẽ cho phép tế bào sống sót mà lẽ ra chúng đã bị loại trừ bởi apoptosis. Gen *ced3* mã cho protein thuộc họ protease Cys được hiểu là các caspase. Gen *ced4* sẽ tạo ra các chức năng như chất tiếp nhận (adaptor) hay đồng yếu tố (cofactor) cần cho chương trình apoptosis được thực hiện bởi các sản phẩm gen của *ced3*.



Hình 3.3 Các bộ phận của chương trình apoptosis ở *C.elegans*. Tổng thể đơn giản và mô hình về vai trò của các gen apoptosis trong việc chương trình hóa sự chết của tế bào *C.elegans*. Một “tín hiệu chết” xuất hiện từ một tế bào sống sẽ dẫn đến khởi động chương trình apoptosis trong tế bào và làm tế bào đó chết. Liệu trình của chương trình chết được kiểm soát bởi các gen với các hiệu ứng âm và dương tính. Gen *ced9* có hiệu ứng thúc đẩy dương liệu trình apoptosis, trong khi đó gen *ced3* và *ced4* có hiệu ứng ức chế âm quá trình này. Nhiều gen khác cũng cần cho sự thực bào và phân giải tiếp các tế bào chết (theo Steller, 1995).

Ngược lại, gen *ced9* lại có hiệu ứng kháng apoptosis, tức là bảo vệ tế bào khỏi apoptosis nhờ gây phân chức năng của gen *ced3/ced4*. Sự bất hoạt *ced9* do đột biến sẽ dẫn đến sự chết của tế bào mà lẽ ra chúng vẫn còn tồn tại trong chương trình phát triển bình thường của *C.elegans*, do hậu quả này mà phôi bị chết. Theo các quan sát này thì gen *ced9* có vai trò đảm bảo cho sự tồn tại của các tế bào để thực hiện các chức năng của cơ thể.

3.3 Các thành phần của chương trình apoptosis ở động vật có xương sống

Việc xác định các thành phần của chương trình apoptosis ở *C.elegans* là xuất phát điểm cho việc phát hiện ra các gen tương đồng ở động vật có vú (Thompson, 1995; Green, 1998; Raff, 1998). Các protein tương đồng ở động vật có vú (ĐVCV) được xác định là 3 protein chủ chốt trong chương trình apoptosis ở *C.elegans* và một mô hình thích hợp đầu tiên của liệu trình apoptosis đã được phác thảo. Tuy nhiên, người ta cũng chỉ rõ rằng kiểu hình apoptosis là dựa trên cơ sở các protein phức hợp và đa năng. Các đường tín hiệu apoptosis khác cũng có liên quan tới vấn đề này, nó phụ thuộc vào sự kích thích và dạng tế bào. Các thành phần chủ chốt của cách hữu hiệu này là một lớp xác định các protease – đó là các caspase. Caspase làm trung gian phân giải nhiều protein và là thành phần thực hiện sự chết của tế bào.

Phần lớn chương trình apoptosis của tế bào ở dạng tiềm ẩn - dạng bất hoạt và chỉ cần một kích thích là được hoạt hóa để khởi đầu cho sự apoptosis.

Vì vậy, các quá trình apoptosis cũng có thể xảy ra mà không cần phải hoạt hóa phiên mã. Nhưng cũng có những dạng apoptosis phụ thuộc vào sự phiên mã.

Khả năng thực hiện chương trình apoptosis được kiểm soát rất chặt chẽ ở các mức độ khác nhau. Điều đó tạo nên sự liên kết các con đường tín hiệu có chức năng kiểm soát sự phân chia tế bào.

3.3.1 Caspase: sự chết do ly giải protein

Mối liên hệ giữa apoptosis và sự ly giải protein trở nên rõ ràng khi có sự tương đồng được thiết lập giữa protein được mã bởi gen *ced3* và một protease đã được biết từ

trước ở ĐVCV là protease ICE (Martin, 1994; Kuman, 1995). Protein ICE (enzyme chuyển đổi interleukin) có liên quan tới sự chín của interleukin 1 β . Interleukin 1 β chín 15,5 KDa được tạo nên từ một protein tiền thân 30KDa nhờ sự ly giải đặc hiệu với sự trợ giúp của protease ICE.

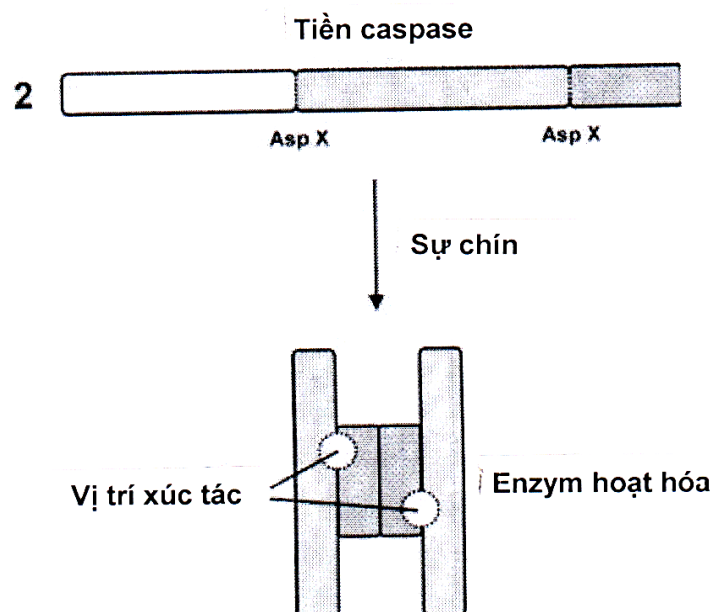
Dựa trên cơ sở các quan sát này mà mối liên quan giữa các protease và protease ICE được xác định một cách nhanh chóng ở ĐVCV và ngày nay được tập hợp thành một họ caspase (salvesen và Dixi, 1997; Thornbery, 1998; Earnshaw và cộng sự., 1999). Tên gọi caspase dựa trên cơ sở các đặc tính đặc biệt của các protease này: caspase sử dụng gốc Cys như là phần ưa nhân và cắt bỏ phần nằm sau gốc Asp.

Cấu trúc và cơ chế

Cũng giống như nhiều protease khác, các caspase được hình thành từ một tiền enzyme bất hoạt 30-50 KDa và được hoạt hóa bởi quá trình ly giải protein. Tiền enzyme có một tiền domain (prodomain) và 2 vị trí phân cắt, nó có thể được hoạt hóa bởi sự ly giải protein tự động.

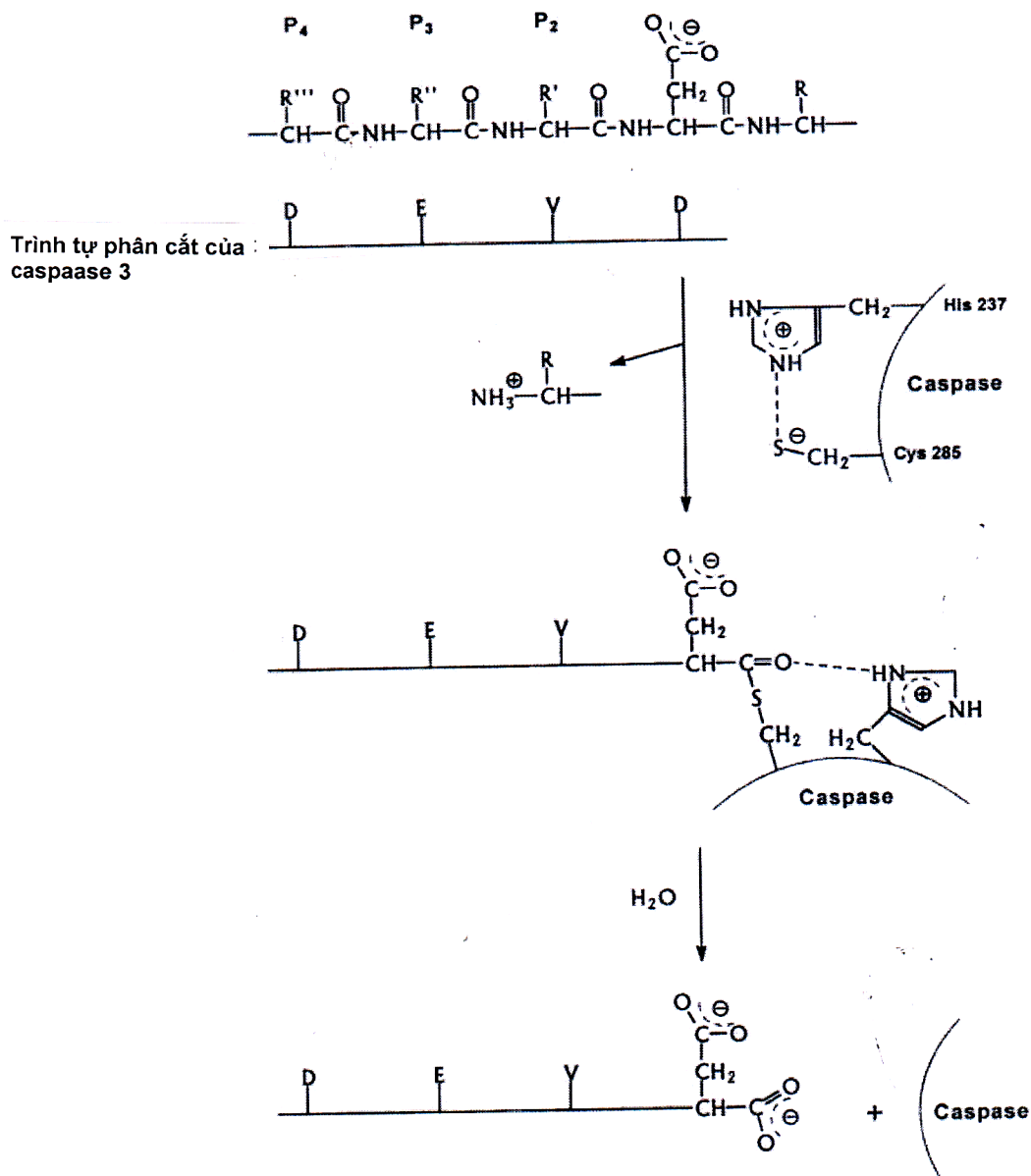
Các nghiên cứu về cấu trúc chỉ rõ, caspase có thể hình thành các tetramer với 2 vị trí hoạt hóa. Tiểu đơn vị xúc tác của caspase được tạo bởi một tiểu đơn vị lớn (12-17 KDa) và một tiểu đơn vị nhỏ (10-12 KDa), hai tiểu đơn vị này tạo nên một dimer dị loại (heterodimer) có một vị trí hoạt hóa gồm các gốc từ cả hai tiểu đơn vị lớn và nhỏ. Hai dimer sau đó lại lắp ráp với nhau để tạo nên một tetramer với hai trung tâm xúc tác (Hình 3.4).

Cơ chế phân giải của caspase được thể hiện trên sơ đồ (Hình 3.5). Đây là một cơ chế protease đặc biệt với bộ đôi xúc tác phân cắt các liên kết peptide. Phần thiol của nhân gốc Cys hình thành liên kết thioacyl đồng hóa trị với cơ chất khi xúc tác. Vòng imidazole của histidine cũng liên quan tới sự xúc tác và nó tạo thuận lợi cho sự thủy phân các liên kết amide trong xúc tác acid/base.



Hình 3.4 Quá trình và cấu trúc của caspase. Quá trình ly giải protein của tiền caspase bằng tự ly giải hoặc bởi một caspase khác để cắt đi hai vị trí (AspX). Tiền domain đầu cuối N được vứt bỏ và hai đoạn khác sẽ được lắp vào để trở thành caspase hoạt hóa, đó là tetramer có hai vị trí hoạt hóa. (Theo Gerhard Krauss. *Biochemistry of Signal transduction and regulations*. Wiley-VCH Verlag GmbH 2001)

Đặc trưng đặc biệt của caspase là tính đặc hiệu phân cắt của chúng rất cao. Sự phân cắt chỉ xảy ra ở đầu cuối C một gốc Asp của protein cơ chất và đòi hỏi một yếu tố nhận dạng khác gồm một trình tự xác định có ít nhất 3 amino acid ở đầu cuối N của vị trí cắt. Các caspase khác nhau rất lớn về tính đặc hiệu phân cắt vì thế mà cơ chất là các protein rất khác nhau. Hiện nay người ta đã xác định được có ít nhất 13 caspase khác nhau được đánh dấu từ 1 đến 13. Những caspase này tham gia vào các quá trình apoptosis và gây lây nhiễm. Protease ICE là caspase 1; caspase 3 được hiểu như một apopain hay CPP32.



Hình 3.5 Sự nhận diện cơ chất và cơ chế phân cắt chính xác của các caspase. Đối với caspase 3, đòi hỏi phải có 4 gốc đặc hiệu cuối N đối với vị trí phân cắt ngoài gốc Asp thiết yếu. Ở bước đầu tiên, hình thành một trung gian thiolacyl đồng hóa trị giữa phần cuối N và caspase, sự phân cắt thủy phân ở bước xảy ra ở bước thứ hai.

(Theo Gerhard Krauss. *Biochemistry of Signal transduction and regulations*. Wiley-VCH Verlag GmbH 2001)

Các cơ chất

Có rất nhiều cơ chất của caspase đã được xác định, một số cơ chất có quan hệ trực tiếp tới sự tồn tại của tế bào. Dưới đây là các ví dụ về các quá trình tế bào quan trọng và các cơ chất đích của sự ly giải protein trong quá trình apoptosis.

Bất hoạt các protein để tránh apoptosis

*Chất ức chế DNAase, ICAD (chất ức chế DNAase được hoạt hóa bởi caspase); ức chế đáp ứng DNAase đối với việc bẻ gãy DNA (Enari và cộng sự., 1998).

*Protein Bel-2: Có chức năng kháng chủ vận chính.

Phân rã các cấu trúc của tế bào

*Các lamin

*Mất sự điều hòa xuống của tế bào: gelsolin, kinase kết dính tiêu điểm (focal adhesion kinase- FAK), kinase hoạt hóa p21 (PAK0).

Bất hoạt sự sửa chữa và tổng hợp DNA

*Poly ADP –ribose polymerase

* Yếu tố sao chép C (replication factor C –[RF-C])

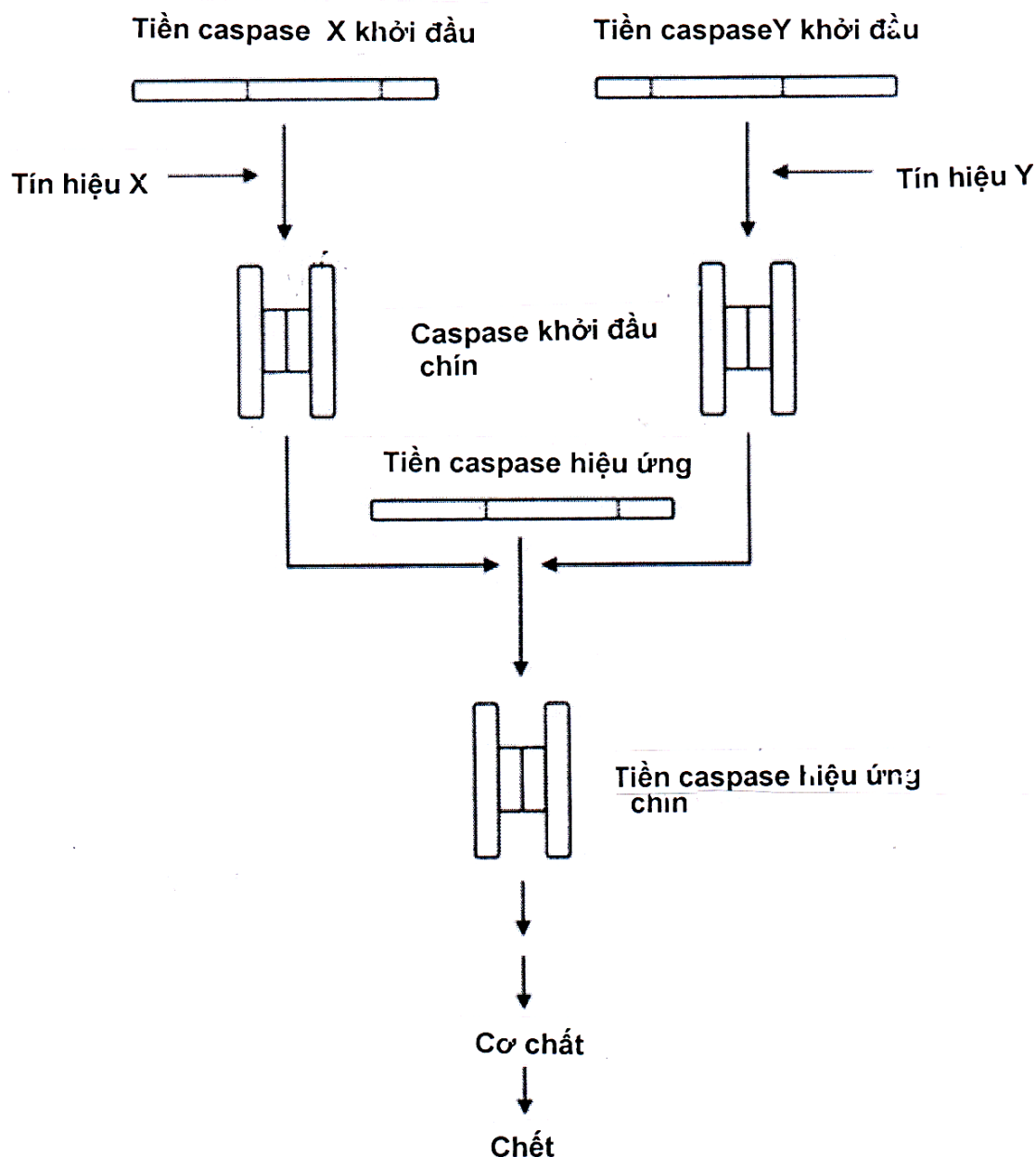
* Protein kinase phụ thuộc DNA.

Sự hoạt hóa và điều hòa

Sự hoạt hóa không được chương trình hóa của các caspase sẽ gây hậu quả nghiêm trọng cho tế bào. Vì thế việc hoạt hóa các caspase phải được kiểm soát rất chặt chẽ. Ở trạng thái bình thường của tế bào thì các caspase là bất hoạt nhưng nó có thể được hoạt hóa một cách nhanh chóng khi có một tín hiệu cảm ứng nhỏ. Hiện tại người ta chưa biết hết các protein có liên quan tới sự hoạt hóa. Có khả năng sự hoạt hóa xảy ra là nhờ một cơ chế phức hợp giống như kiểu đông máu. Dựa trên cơ sở chức năng của chúng đối với apoptosis mà các caspase được chia thành 2 lớp (Hình 3.6); *caspase khởi đầu* (caspase 8 và 9) và *caspase hiệu ứng* (caspase 3,6 và 7).

Caspase khởi đầu nhận các tín hiệu tiền apoptosis và hoạt hóa một lớp (thác) caspase. Chúng được hoạt hóa bởi sự tương tác với receptor vận chuyển màng hoặc bởi các ảnh hưởng của độc tố tế bào. Vì thế một phức hợp được hình thành gọi là thể apoptosis (apoptosome) (Hình 3.4). Các caspase hiệu ứng được hoạt hóa bởi caspase ngược (upstream caspase) thông qua một cơ chế thác (cascade). Chúng là các yếu tố thực hiện apoptosis mà khởi đầu là phân giải các protein chính và trực tiếp gây chết tế bào.

Trên cơ sở của việc phát ra các kích thích và bản chất của các thành phần liên quan thì ít nhất có 2 con đường tín hiệu apoptosis khác biệt dẫn tới sự hoạt các caspase hiệu ứng. Một mặt nó có liên quan tới các hệ thống receptor, mặt khác sự biệt hóa cũng có thể được phát ra từ các stress tế bào. Hai cách này khác nhau về cơ chế hoạt hóa caspase khởi đầu nhưng lại sử dụng cùng một caspase hiệu ứng ít nhất là ở một số công đoạn.



Hình 3.6 Các caspase khởi đầu và caspase hiệu ứng trong apoptosis.

Bộ phận thiết yếu của chương trình apoptosis là thác caspase. Apoptosis được khởi đầu bằng quá trình ly giải protein của tiền caspase khởi đầu dưới ảnh hưởng của nhiều tín hiệu. Caspase khởi đầu chín xúc tác cho quá trình tiền caspase hiệu ứng trở thành enzyme hoạt hóa, chúng phân giải các cơ chất đặc hiệu và/hoặc hoạt hóa xa hơn các procaspase. Theo cách này thì caspase có thể được hoạt hóa và dần dần thành một thác caspase.

(Theo Gerhard Krauss. Biochemistry of Signal transduction and regulations. Wiley-VCG Verlag GmbH 2001)

Cơ chế hoạt hóa caspase

Các tế bào có hai cơ chế để hoạt hóa caspase:

*Phân cắt ly giải protein ở một lớp caspase: một tiền caspase được hoạt hóa ly giải protein bởi một caspase hoạt hóa, ngược với con đường tín hiệu apoptosis. Cơ chế này được sử dụng đặc hiệu ở phần hiệu ứng của apoptosis.

*Hoạt hóa cảm ứng lẫn cận một tiền caspase khởi đầu: nhiều quan sát ủng hộ cho mô hình hoạt hóa caspase trong đó một tiền caspase khởi đầu có hoạt tính thấp sẽ được hoạt hóa bởi một kích thích - cảm ứng tập hợp (Hengartner, 1998). Tiền caspase này có hoạt tính protease thấp chỉ tương đương 1 – 25 caspase chín. Nếu tiền caspase được tuyển mộ với một lượng lớn thì cũng có thể đủ để hoạt hóa cho một tiền caspase thành caspase chín. Sự tập hợp các tiền caspase được trợ giúp bởi các yếu tố như FADD hoặc Apaf1/Cyt c, chúng được hoạt hóa bởi các tín hiệu bên ngoài (ligand gắn vào các receptor chết; sự hủy hoại ty thể). Cơ sở của sự tập hợp này là sự tương tác protein-protein giữa các domain đặc hiệu của caspase và các đồng yếu tố. Người ta đã xác định được 2 dạng cơ bản của domain tương tác. Tiền caspase 8 có 2 cặp *domain hiệu ứng chết (death effector domain –DED)*, ở đó tiền caspase 1,2,4,5 và 9 có chứa domain tuyển mộ caspase (caspase recruitment domain –CARD). Các domain được hình thành tương tự như trong các dạng trong tiền caspase và đồng yếu tố và có khả năng hình thành nên các tập hợp lớn hơn. Theo mô hình này thì chức năng của đồng yếu tố như là các chaperon apoptosis, nhờ hình thành các tập hợp đặc biệt mà hoạt hóa được các caspase khởi đầu.

3.3.2 Họ protein Bcl-2

Đầu tiên protein Bcl-2 được xác định là một protein ung thư (oncoprotein) được mã bởi một gen chịu tác động bởi sự chuyển vị của NST 14 và 18 trong u lympho B. Tuy nhiên, mới đây người ta xác định rằng protein Bcl-2 không liên quan tới sự điều hòa chu kỳ tế bào, nó trái ngược với nhiều protein ung thư khác vì thế nên nó không thích hợp với hình ảnh của sự sinh ung thư kinh điển. Hơn nữa, nó cũng được xác định là tương đồng với protein ced9 của *C.elegans*, có chức năng kháng apoptosis trong cơ thể.

Protein Bcl-2 là thành viên của một họ protein có liên quan đến chương trình apoptosis ở các tế bào động vật có vú (Reed, 1997; Adams và Cory, 1998). Hiện nay đã biết có ít nhất 15 thành viên họ Bcl-2, nó có hiệu ứng âm hoặc dương đối với sự khởi đầu chương trình apoptosis. Tất cả các thành viên của họ Bcl-2 đều có ít nhất một bản phiên mã mô tip BH (BH, Bcl-2) có 4 dạng (type) (BH1 – BH4).

Các thành viên của họ Bcl-2 kháng apoptosis

Các thành viên kháng apoptosis của họ Bcl-2 (Bcl-2, BclX, BclW, A1, Mcl-1) ức chế apoptosis bằng các hiệu ứng độc tế bào khác nhau. Tối thiểu chúng cũng chứa các mô tip BH1 và BH2. Protein Bcl-2 chứa tất cả 4 mô tip BH. Về cơ chế của kháng apoptosis (xem các mô hình trên).

Chức năng kháng apoptosis của protein Bcl-2 đã được chứng minh rõ ràng bằng thực nghiệm. Sự biểu hiện quá mức của nó có thể ngăn chặn được sự khởi đầu chương trình

apoptosis ở nhiều dạng tế bào. Về chức năng gây ung thư của Bcl-2, người ta có thể giải thích hiệu ứng kháng apoptosis là do sự biểu hiện quá mức của chúng: protein Bcl-2 ở mức cao sẽ kiểm chế sự khởi đầu chương trình apoptosis và khối u có thể tiến triển. Trong trường hợp này, các tế bào đã bị hư hại mà còn sống sót thì sẽ được loại đi bằng apoptosis một cách bình thường.

Các thành viên của họ Bcl-2 tiền apoptosis

Có hai họ tiền apoptosis của protein Bcl-2. Một họ bao gồm các protein Bax, Bak và bcl-2, chúng có cấu trúc tương tự như protein Bcl-2. Có sự liên kết với protein kiểm chế khối u p53 thông qua protein bax (xem Hình 3.6).

Protein của một họ khác là protein BH3 vì chúng chỉ chứa domain BH3. Thành viên quan trọng của họ BH3 là protein Bad, nó là một bộ phận của con đường tín hiệu P13 – kinase/Akt (xem hình 3.6).

Cơ sở hóa sinh sự hoạt động của các thành viên họ Bcl-2 mới chỉ biết phần nào. Các protein Bcl-2 kháng apoptosis có thể có chức năng là do ức chế trực tiếp sự hoạt hóa caspase. Chắc chắn rằng các protein tiền apoptosis sẽ tương tác với các protein kháng apoptosis và làm dừng sự ức chế của chúng đối với apoptosis.

Nhiều thành viên của họ Bcl-2 có thể tương tác với các thành viên khác thông qua domain BH và hình thành nên phức hợp hetero-oligomer trong đó có sự tác động để trung hòa lẫn nhau. Mối liên quan giữa protein tiền apoptosis và protein họ Bcl-2 kháng apoptosis sẽ giúp cho việc xác định tính nhạy cảm của tế bào đối với apoptosis.

3.3.3 Các đồng yếu tố của sự hoạt hóa caspase

Sự hoạt hóa caspase cần sự trợ giúp của nhiều đồng yếu tố (cofactor) hay còn gọi là các chất hoạt hóa (activator) hay chất tiếp nhận (adaptor).

Chức năng chính của các đồng yếu tố là tạo nên sự tập hợp và vì vậy mà hoạt hóa được các tiền caspase. Quá trình này xảy ra là do sự tương tác đặc hiệu protein – protein với sự trợ giúp của các mô tip cấu trúc thông thường. Các ví dụ về mô tip là các domain chết (death domain –DD), domain hiệu ứng chết (death effector domain –DED) và domain tuyển mộ caspase (caspase recruitment domain –CARD), tất cả đều có cấu trúc tương tự với 6 vòng xoắn α .

Các đồng yếu tố cho apoptosis qua trung gian receptor chết

Trong các trường hợp receptor chết Fas (sự hoạt hóa caspase có liên quan tới một protein tương tác với phần bào chất của receptor và được hiểu như là protein FADD (domain chết liên quan với Fas). Protein FADD có cấu trúc phân biệt, làm trung gian tương tác đặc hiệu với các protein khác. Sự tương tác qua domain chết với receptor và qua domain hiệu ứng chết với caspase tương ứng (ở đây là caspase 8).

Các đồng yếu tố Apaf1 và cytochrome c

Protein Apaf1 được xác định là một đồng yếu tố trung tâm trong apoptosis độc tế bào. Protein Apaf1 tương đồng với protein ced4 của *C.elegans*. Nó gắn vào caspase khởi đầu

với sự trợ giúp của mô tip CARD. Mô tip CARD có ở protein Apaf1 cũng như ở nhiều caspase khác (caspase 1,2,4,5 và 9).

Một đồng yếu tố xa hơn trong sự hoạt hóa ở hệ thống này là cytochrome c. Sự hoạt hóa phụ thuộc ATP xảy ra ở một phức hợp caspase, protein Apaf1 và Cyt c – cũng được hiểu là thể apoptosis (apoptosome).

3.3.4 Điều hòa nội bào

Khả năng hoạt hóa caspase của các đồng yếu tố được điều hòa bởi nhiều protein khác nữa, chúng tương tác trực tiếp với các đồng yếu tố.

Một số ví dụ về sự điều hòa:

Protein Flip

Những protein này tương tác với đồng yếu tố FADD trong apoptosis qua trung gian receptor chết và ngăn chặn hiệu ứng hoạt hóa của nó.

Các thành viên của họ Bcl-2

Các thành viên của họ Bcl-2 kháng apoptosis kiểm soát apoptosis bằng nhiều cơ chế mà không gắn trực tiếp với caspase. Các protein Bcl-2 có thể tương tác với các đồng yếu tố và ức chế sự hoạt động của chúng. Chúng cũng có thể tác động kháng apoptosis bằng cách gắn vào ty lạp thể và can thiệp vào sự giải phóng cytochrome c. Hơn nữa, chúng còn có thể tương tác với các protein tiền apoptosis khác, tức là với các thành viên tiền apoptosis trong họ của chúng.

Các chất ức chế apoptosis

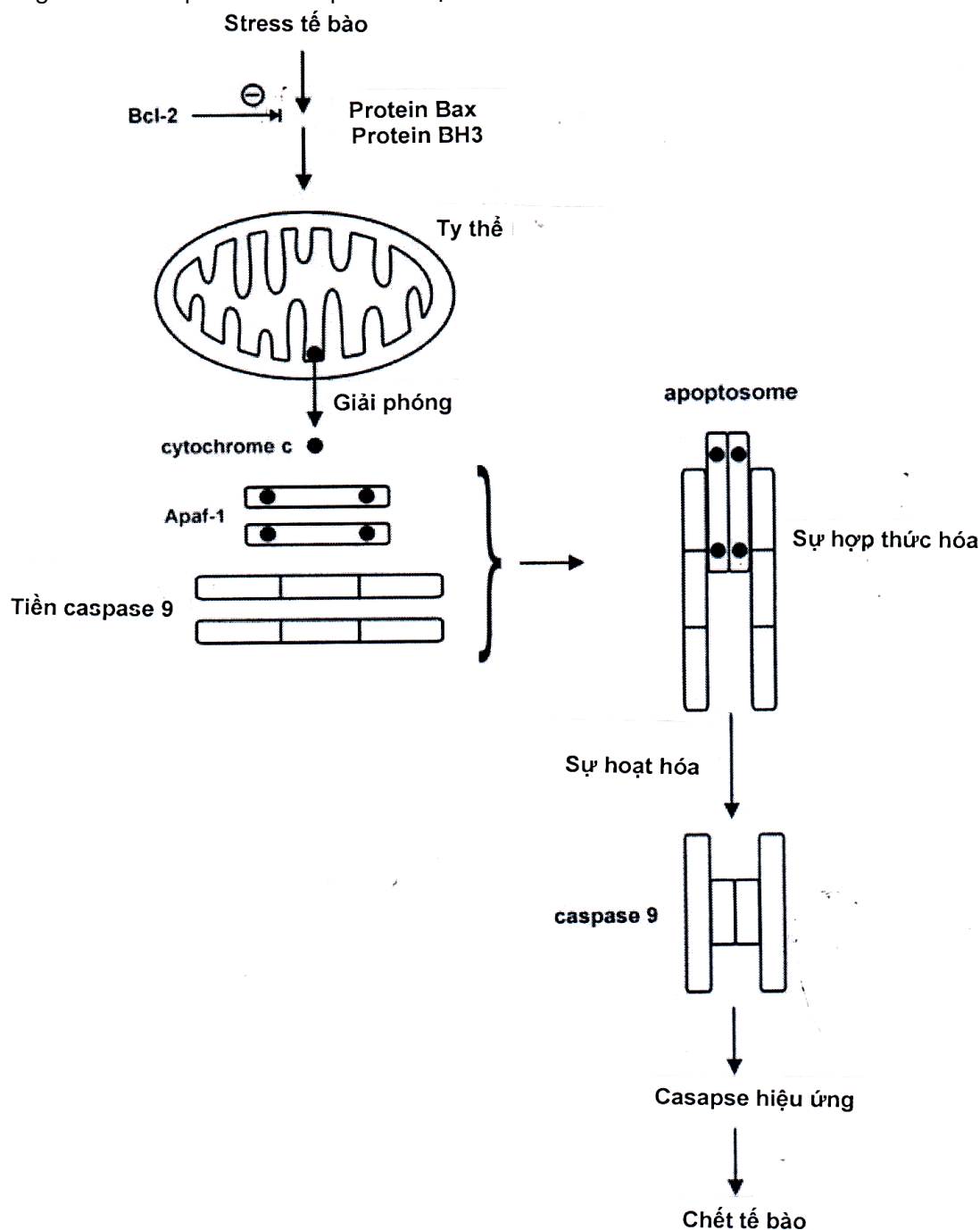
Các protein này ức chế apoptosis nhưng chưa xác định được vị trí tác động của chúng. Một số protein rõ ràng là gắn vào các caspase và ức chế trực tiếp apoptosis.

3.4 Apoptosis qua trung gian stress: con đường cytochromec/Apaf1

Ngoài apoptosis qua trung gian receptor còn có con đường chính khác nữa được hoạt hóa bởi các dạng stress tế bào. Các ví dụ về hiệu ứng stress là: cảm ứng apoptosis với bức xạ γ và UV, xử lý với các thuốc gây độc tế bào như actinomycin D hay khi loại trừ các cytokine. Do hệ quả stress nên tiền caspase 8 có thể được hoạt hóa bởi một cơ chế phức tạp mà chúng ta chưa hiểu rõ hoàn toàn. Mô hình về sự hoạt hóa được thể hiện ở (Hình 3.7).

Trong mô hình này, ty lạp thể có vai trò quan trọng trong việc khởi đầu apoptosome (Green và Reed, 1998). Theo mô hình này thì cytochrome c được giải phóng trước tiên khỏi ty thể để vào tế bào chất (do hệ quả của stress). Chức năng của cytochrome c giống như một đồng yếu tố hoạt hóa caspase khởi đầu 8 bằng cách gắn với phức hợp caspase 8 và đồng yếu tố Apaf1. Phức hợp hetero – oligomer của tiền caspase 8, Apaf1 và cytochrome c sẽ tạo nên thể apoptosome (apoptosome). Cũng cần ATP cho dạng hoạt hóa qua trung gian Apaf1 (chứa một vị trí gắn ATP/dATP). Chức năng của việc gắn ATP chưa được rõ;

nhưng có thể là có liên quan tới sự thay đổi cấu trúc phụ thuộc ATP trong thể apoptosis. Trong thể apoptosis xảy ra sự hoạt hoá xúc tác tự động của caspase 8 để trở thành caspase chín, sau đó hoạt hóa thác caspase của các caspase hiệu ứng 3,6 và 7. Cũng chưa rõ là cytochrome c giải phóng khỏi ty thể lúc khởi đầu như thế nào. Có dẫn liệu cho rằng nó có liên quan với các protein họ Bcl-2.



Hình 3.7 Tín hiệu apoptosis trong quá trình apoptosis trung gian bởi stress.

Trong mô hình này, cytochrome c được giải phóng khỏi ty thể qua trung gian stress tế bào. Các protein tiền apoptosis Bax và BH3 trợ giúp cho sự giải phóng cytochrome c, trong khi đó thì protein Bcl-2 kháng apoptosis

lại có hiệu ứng ức chế. Cytochrome c hòa tan trong tế bào gắn với đồng yếu tố Apaf1, sau đó được gắn qua mô típ CARD của nó với tiền caspase 9 thành phức hợp có tên là thể apoptosis (apoptosome). Trong phức hợp này tiền caspase 9 được xử lý thành caspase chín, sau đó nó hoạt hóa caspase hiệu ứng xuôi dòng và làm chết tế bào. (Theo Gerhard Krauss. Biochemistry of Signal transduction and regulations. Wiley-VCH Verlag GmbH 2001)

Chính protein Bcl-2 kháng apoptosis định vị ở màng ty thể có thể có hiệu ứng ức chế giải phóng cytochrome c. Protein kháng apoptosis Bax cũng có thể đi qua đi lại giữa tế bào chất và ty thể. Vì một số thành viên của họ Bcl-2 bao gồm cả Bax hình thành một lỗ ở màng ty thể (dựa trên các nghiên cứu về cấu trúc) nên protein Bax có thể hình thành một cấu trúc lỗ trên màng cho phép các ion đi qua. Có khả năng lỗ này được hình thành do sự hoạt hóa của protein Bax nên nó lại cho phép cytochrome c ra khỏi ty thể và vì thế mà có khả năng hoạt hóa được caspase khởi đầu.

Nhìn toàn cục, sự điều hòa hoạt hóa caspase vẫn còn nhiều điều chưa rõ vì nhiều yếu tố chưa rõ chức năng cũng liên quan tới sự hoạt hóa. Nhưng chắc chắn rằng còn có một con đường apoptosis khác ngoài 2 con đường đã mô tả ở đây. Cũng không thể loại trừ sự “xuyên âm” (crosstalk) có thể xảy ra giữa các con đường.

3.5 Apoptosis phát sinh bởi receptor chết

Apoptosis trong hệ miễn dịch thường liên quan tới các hệ thống receptor “chết” (Yuan, 1997; Askenazi và Dixit. 1998). Các receptor chết thuộc siêu họ receptor yếu tố hoại tử khối u (tumor necrosis factor –TNF), nó được đặc trưng bởi một domain ngoại bào Cys và một domain nội bào tương đồng được hiểu như “domain chết”. Receptor chết đặc trưng nhất là Fas (cũng được hiểu là CD95) và receptor yếu tố hoại tử mô I (tumor necrosis factor receptor I-TNFR1). Ligand của Fas (Fas ligand) là một protein homotrimer gây nên sự oligomer hóa các receptor của nó trên gắn kết. Kết hợp với nó là nhóm các domain chết và đồng yếu tố FADD. Protein FADD gắn với mô típ tương đồng trong protein caspase thông qua mô típ DED của nó.

Mô hình con đường tín hiệu Fas của apoptosis được thể hiện trên (Hình 3.8). Chức năng đồng yếu tố của FADD có thể là ngăn chặn sự tương tác với FLIP điều hòa.

Chức năng của tiền caspase 8 trong hệ thống này như một caspase khởi đầu, bởi vì tín hiệu hoạt hóa là của thác caspase xuôi dòng (downstream).

Mô típ DED của caspase 8 được định vị trong một tiền domain lớn. Các mô típ tương tự cũng thấy ở các caspase khác với các tiền domain lớn (caspase 2,8 và 9).

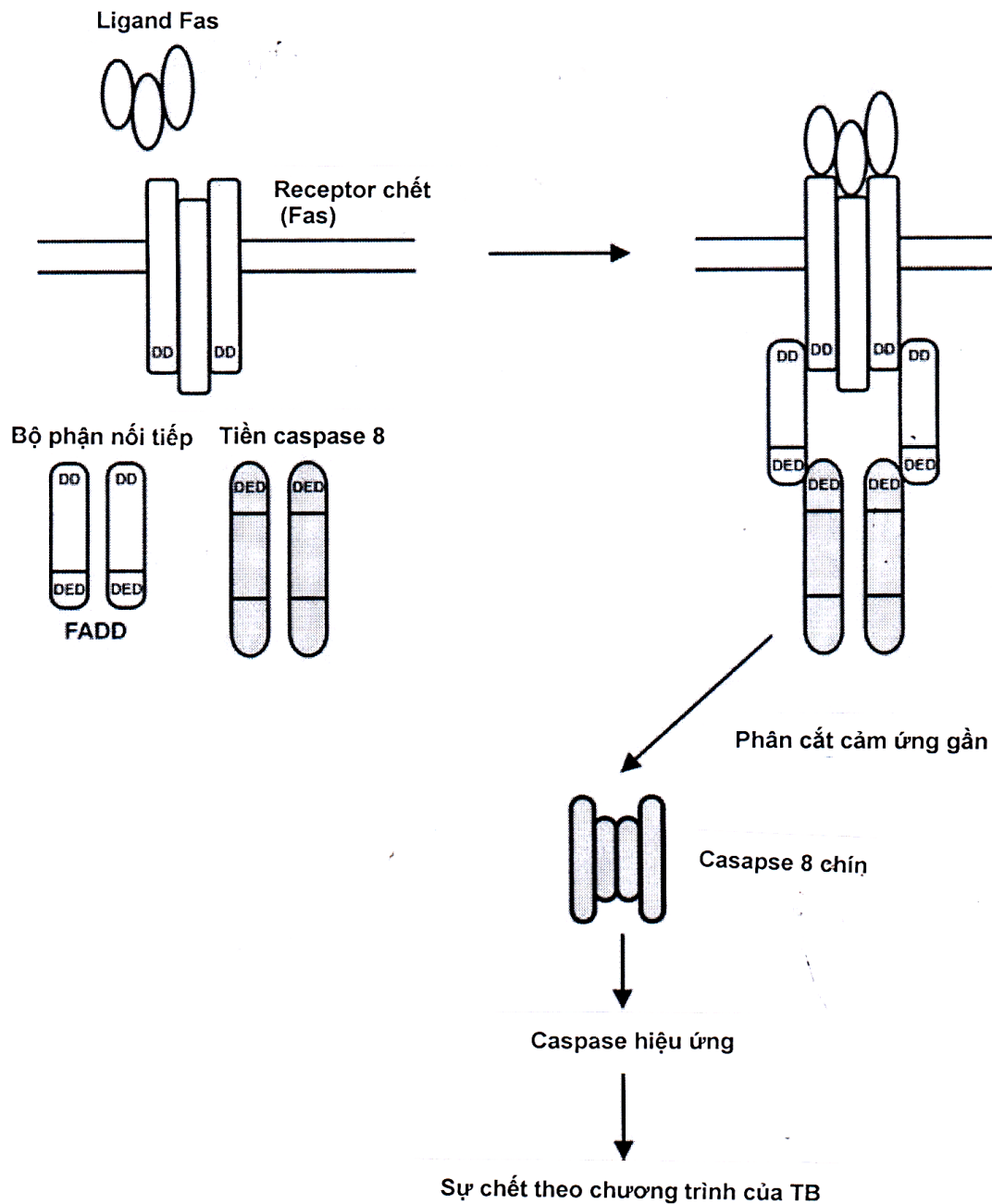
Với sự tuyển mộ bởi FADD, caspase 8 oligomer hóa đã tạo nên được sự hoạt hóa do tự phân cắt. Caspase 8 sau đó lại hoạt hóa ly giải protein các caspase hiệu ứng xuôi dòng như caspase 9 và làm chết tế bào.

Sự gắn kết ligand của receptor Fas tạo ra một lớp receptor cùng với các đồng yếu tố FADD (protein liên kết Fas với domain chết) chúng tương tác với receptor thông qua domain chết (DD) của nó. Tiền caspase 8 liên kết với phức liên kết receptor của Fas. Do lớp protein này mà xảy ra sự phân cắt cảm ứng tiền caspase 8 để thành caspase 8 khởi đầu chín, do vậy mà hoạt hóa caspase hiệu ứng xuôi dòng và làm chết tế bào.

Sự chuyển đổi tín hiệu bởi receptor TNF liên quan với Fas thì phức tạp hơn và có thể qua trung gian bởi các tín hiệu tiền apoptosis cũng như kháng apoptosis. Trong tình trạng bình thường, việc gắn TNF vào các receptor của nó sẽ làm khởi đầu một chuỗi tín hiệu để hoạt hóa con đường MAPK và tạo nên tín hiệu biểu hiện c-jun. Ngoài con đường IxB-NFxB có

thể được hoạt hóa thì cả NF κ B và c-jun đều có hiệu ứng kháng apoptosis và thúc đẩy tăng sinh.

Tuy nhiên, trong một số hoàn cảnh xác định như ức chế tập hợp protein thì sự hoạt hóa receptor TNF lại có hiệu ứng tiền apoptosis, trong đó các caspase sẽ được hoạt hóa và khởi đầu sự chết của tế bào.

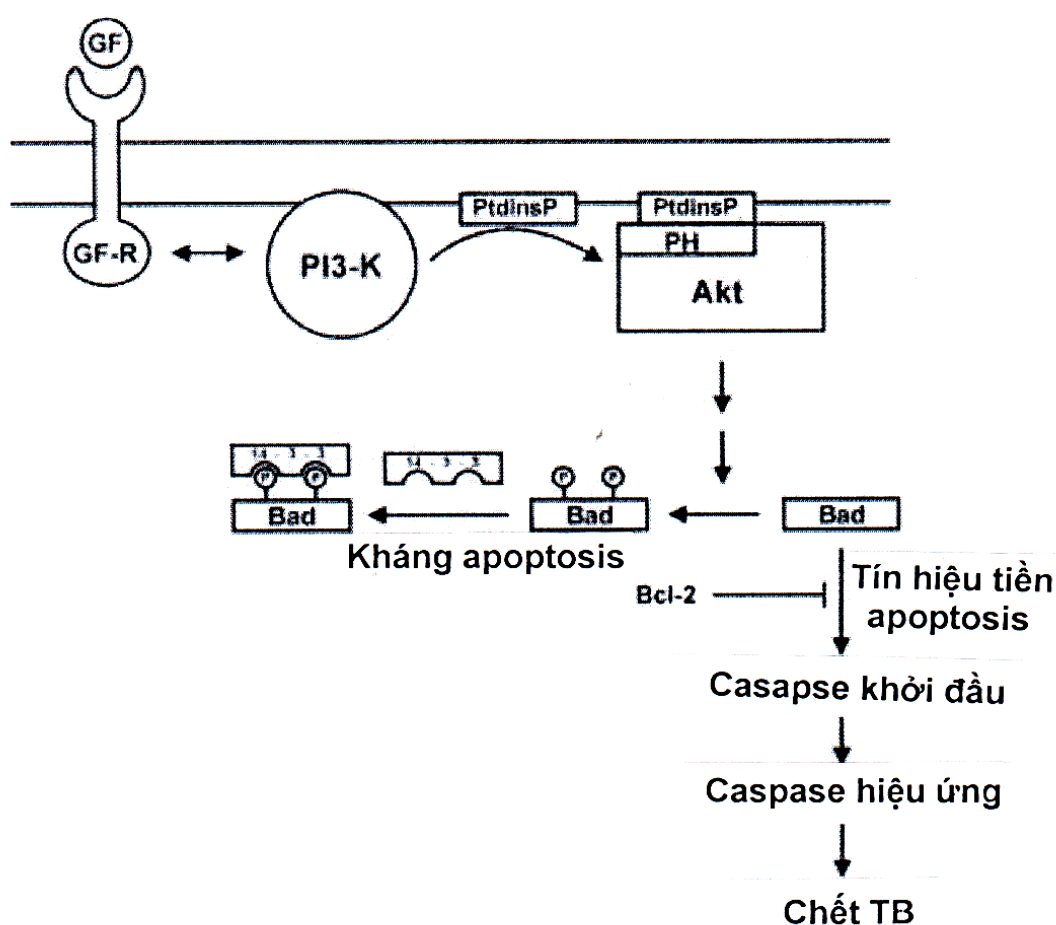


Hình 3.8 Mô hình apoptosis phát sinh bởi receptor Fas.

3.6 Apoptosis và con đường tín hiệu tế bào

Giống như hầu hết các chức năng ở các tế bào động vật, chương trình apoptosis cũng được điều hòa bởi tín hiệu từ các tế bào khác, nó có thể làm hoạt hóa hoặc kiểm chế. Ngoài sự kiểm soát ngoại bào, chương trình cũng được kiểm soát bởi con đường tín hiệu nội bào. Với các mức độ khác nhau, chương trình apoptosis có liên quan tới sự tương tác tế bào- tế bào, con đường tín hiệu kiểm soát yếu tố tăng trưởng, chu kỳ tế bào và hệ thống kiểm tra sự hư hại DNA.

Nhìn chung, sự hiểu biết của chúng ta về mối liên hệ giữa các tín hiệu nội bào và ngoại bào rất chưa đầy đủ và chỉ giới hạn ở một vài ví dụ sẽ được đề cập dưới đây:



Hình 3.9 Tín hiệu kháng apoptosis bởi con đường P13-kinase/Akt kinase.

Con đường p13 kinase/Akt kinase gây ảnh hưởng tới apoptosis thông qua sự phosphoryl hóa protein Bad - một thành viên của họ protein Bcl-2. Hoạt hóa con đường P13-kinase dẫn đến sự phosphoryl hóa của protein Bad. Protein Bad ở dạng không phosphoryl hóa sẽ tham gia vào sự hoạt hóa caspase khởi đầu và vì vậy mà có hiệu ứng tiền apoptosis. Sự phosphoryl hóa protein Bad bởi Akt

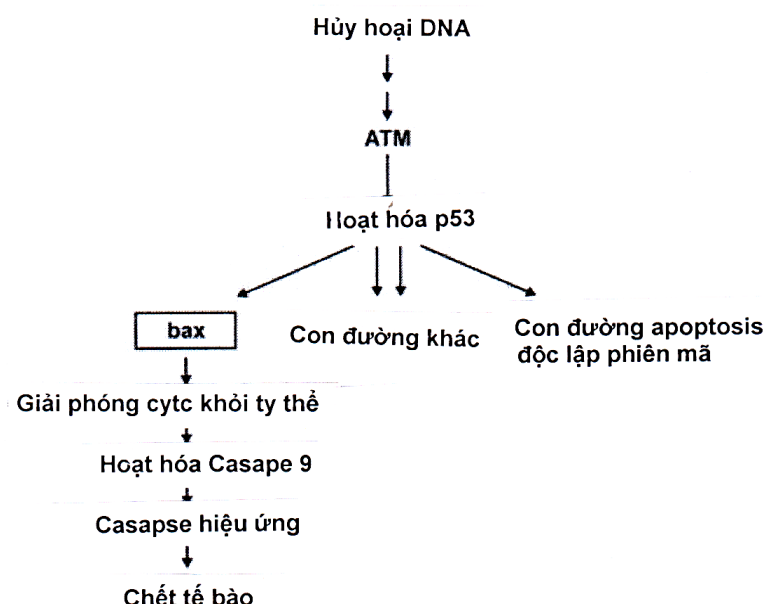
kinase (hay là kinase liên quan) có hiệu ứng kháng apoptosis vì sự phosphoryl hóa protein Bad là sự liên kết cơ chất của các protein 14-3-3. Bad vì thế mà bị cô lập ở trạng thái bất hoạt và không có khả năng phát sinh ra apoptosis.

(Theo Gerhard Krauss. *Biochemistry of Signal transduction and regulations*. Wiley-VCG Verlag GmbH 2001)

p13-kinase và apoptosis

Ngoài các tín hiệu thúc đẩy tăng trưởng, p13-kinase có thể làm trung gian cho các tín hiệu kháng apoptosis. Sự dẫn truyền tín hiệu kháng apoptosis bắt đầu từ p13-kinase tới Akt-kinase, nó được hoạt hóa bởi tín hiệu PtdInsP3 được tạo ra từ p13-kinase. Protein Bad được xác định là một cơ chất của Akt-kinase. Protein Bad là thành viên tiền apoptosis của họ Bcl-2. Nó được phosphoryl hóa bởi Akt-kinase ở một vài gốc Ser và hiệu ứng tiền apoptosis của nó vì thế mà bị ức chế (Datta và cộng sự., 1997). Các bằng chứng thực nghiệm cho thấy protein 14-3-3 có liên quan tới sự ức chế; những protein này gắn với gốc phosphoserine của protein Bad và vì thế mà làm bất hoạt chức năng tiền apoptosis.

p53 và apoptosis



Hình 3.10 Con đường apoptosis trung gian bởi sự hủy hoại DNA và p53.

Sự hiện diện của các tổn thương DNA sẽ hoạt hóa ATM kinase và dẫn tới tăng nồng độ p53. Ở con đường phụ thuộc phiên mã, chức năng p53 như là một chất hoạt hóa phiên mã cho gen bax. Tăng lượng protein Bax sẽ tạo thuận lợi cho việc giải phóng cytochrome c khỏi ty thể và tạo ra sự hoạt hóa caspase khởi đầu và caspase hiệu ứng. P53 cũng ảnh hưởng tới apoptosis bằng các con đường ít đặc trưng hơn và một số độc lập với sự phiên mã.

(Theo Gerhard Krauss. *Biochemistry of Signal transduction and regulations*. Wiley-VCG Verlag GmbH 2001)

Protein p53 là trung tâm con đường tín hiệu apoptosis khởi đầu sự hủy hoại DNA và làm khiếm khuyết liệu trình chu kỳ tế bào. Phụ thuộc vào dạng tế bào mà apoptosis cảm ứng p53 có thể đòi hỏi sự hoạt hóa phiên mã (Polyak và cộng sự., 1997) hoặc có thể xảy ra mà không cần sự tổng hợp RNA và protein mới (Hình 3.10).

Một đích quan trọng của phiên mã protein p53 là có thể làm cảm ứng apoptosis bởi gen *bax*. Protein Bax thuộc họ các protein Bcl-2 và có hiệu ứng tiền apoptosis. Có suy đoán rằng tăng cảm ứng tập trung Bax sẽ dẫn đến sự hình thành các lỗ ion trong ty thể và cytochrome c được giải phóng vào tế bào chất thông qua các lỗ này. Sau đó cytochrome c lại có chức năng như một đồng yếu tố và cùng với protein Apaf1 hoạt hóa tiền caspase 8 và khởi đầu chương trình apoptosis.

Sự hoạt chuyển gen tiền apoptosis không phải chỉ bằng con đường protein p53 để hoạt hóa chương trình apoptosis. Có bằng chứng cho thấy các thể biến dị (variant) của p53 lại độc lập với protein Bax và không khởi động ở mức phiên mã mà vẫn có thể gây nên apoptosis (Haffner và Oren. 1995; Ko và Prives., 1996). Vì thế đã chứng minh được rằng có sự phân phối điều hòa lại p53 của receptor chết Fas từ tế bào chất tới màng (Bennet và cộng sự., 1998). Tuy nhiên, những hiểu biết về các cơ chế này còn rất hạn chế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. Bernard R. Glick, Jack J. Pasternak. Công nghệ sinh học phân tử (Tài liệu dịch) Nhà xuất bản Khoa Học Kỹ thuật 2007.
2. Trần Thúy Hạnh. Một số khía cạnh về Di ứng Miễn dịch lâm sàng hiện đại. Nhà xuất bản Y Học 2007.
3. Nguyễn Văn Kinh. Gen trị liệu. Nhà xuất bản Y Học 2005.
4. Al Attar N, Carrio C, Ghostine S, et al. Long-term (1 year) functional and results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. Cardiovasc Res 2003.
5. Alexander Battler. Stem cell and Gene- Based Therapy. Frontier in Regenerative Medicine. Springer-Verlage london Limited 2006.
6. Allison MR, Poulsom R, Feffery R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. Nature 2000;406(6793):257.
7. Anthony Meager. Gene Thrapy Technologies, applications and regulations. John Willey & Sons Ltd 1999.
8. Banfi A, Bianchi G, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. Tissue Eng 2002.
9. Barry FP, Muphy JM. Mesenchymal styem cells; clinical aplication and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol 2004.
10. Bosch A, Perret E, Desmaris N, Trono D, Heard JM. Reversal of pathology in the entire brain of mucopolysaccharidosis type VII mice after lentivirus-mediated gene transfer. Hum Gene Ther 2000.
11. Bruce A. Voyles. Biology of Viruses. Mcgraw-Hill international edition 2002.
12. Do Thi NA, Sailluor P, Ferrero L, Dedieu JF, Mallet J, Paunio T. delivery of GDNF by an E1, E3/E4 deleted adenoviral vector and driven by a GFAP promoter prevents dopaminergic neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. Gene Ther 2004.
13. During MJ, Naegele JR, O'Malley KI, Geller AI. Long-term behavioral recover in parkinsonian rates by an HSV vector expressing tyrosine hydroxylase. Science 1999.

14. Elliger SS, Elliger CA, Aguilar Cp, Raju NR, Watson GL. Elimination of lysosomal storage in brain of MPS VII mice treated by intrathelial administration of an adeno-associated virus vector. *Gene Ther* 1999;1175-1178.
15. Gerhard Krauss. *Biochemistry of Signal transduction and regulations*. Wiley-VCG Verlag GmbH 2001.
16. Korbiling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair: a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003.
17. Leoborn B, Garcin I, Menasche P, et al. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Acad Sci USA* 2003.
18. Leone P, Janson CG, Bilaniuk L, et al. Aspartoacylase gene transfer to the mammalian central nervous system with therapeutic implications of Canavan disease. *Ann Neurol* 2000.
19. Li RK, Mickle DA, Weisel RD, et al. Optimal time for cardiomyocyte transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury. *Ann Thorac Surg* 2001.
20. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM, Gage FH. Highly efficient and sustained gene transfer , intergration and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brain injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996.
21. Odorico JS, Kaufman Ds, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001.
22. Peter J. Quesenberry, Gary S. Stein, Bernard G. Forget, Sherman M. Weissman. *Stem cell Biology and Gene Thrapy*. Willey-Liss 2005.
23. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Cirs Res* 2004.
24. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2000.
25. Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001..
26. Suva D, Garavaglia G, Menetrey J, et al. Non-hematopoietic human marrow contains long-lasting, pluripotent mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2004.
27. Thomas F. An introduction to molecular medicine and gene therapy. A John Willey & Sons, inc., publication 2001.
28. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002.

Các trang web:

1. <http://stemcells.nih.gov/info/basics/>
2. <http://www.cato.com/biotech>
3. <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/biotechm.htm>
4. <http://en.wikipedia.org/wiki/biotechnology>
5. <http://www.Nature.com/ntb/index.htm>

6. www.lieberpub.com/hum
7. www.med.unc.edu/genether
8. <http://en.wikipedia.org/wiki/Antisense>
9. <http://en.wikipedia.org/wiki/ribozyme>

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

THỰC HÀNH ỨNG DỤNG GEN TRỊ LIỆU

Chịu trách nhiệm xuất bản

HOÀNG TRỌNG QUANG

372



Biên tập: BS. NGUYỄN HẢI YẾN
Sửa bản in: BS. NGUYỄN HẢI YẾN
Trình bày bìa: BS. NGUYỄN TUẤN ANH
Kỹ thuật vi tính: NGUYỄN THỊ ÂN

In 500 cuốn, khổ 19x27 cm tại Xưởng in Nhà xuất bản Y Học.
Số đăng ký kế hoạch xuất bản:
In xong và nộp lưu chiểu quý II năm 2007.