

Wędrowska Ewelina, Gawroński Maciej, Wandtke Tomasz, Goede Arkadiusz, Wędrowski Mateusz, Piskorska Elżbieta. Niewirusowy transfer genów do komórek skóry – wybrane metody = Non-viral gene transfer into skin cells – selected methods. *Journal of Education, Health and Sport*. 2016;6(1):157-170. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.45147>
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/45147>
<https://pbn.nauka.gov.pl/works/704486>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 755 (23.12.2015).
755 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Author (s) 2016;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 15.12.2015. Revised 12.01.2016. Accepted: 25.01.2016.

Niewirusowy transfer genów do komórek skóry – wybrane metody Non-viral gene transfer into skin cells – selected methods

**Ewelina Wędrowska¹, Maciej Gawroński¹, Tomasz Wandtke¹, Arkadiusz Goede¹,
Mateusz Wędrowski², Elżbieta Piskorska³**

¹Zakład Genoterapii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

²Zakład Pozytonowej Tomografii Emisyjnej i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

³Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

¹Department of Gene Therapy, Faculty of Medicine, Nicolaus Copernicus University Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland

²Department of Positron Emission Tomography and Molecular Diagnostics, Nicolaus Copernicus University Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland

³Department of Pathobiochemistry and Clinical Chemistry, Nicolaus Copernicus University Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland

Streszczenie

Wprowadzenie:

Skóra jako największy i najłatwiej dostępny narząd stanowi atrakcyjny cel dla terapii genowej, która od wielu lat budzi ogromne nadzieje środowiska naukowego. Jednakże, próby terapii przeprowadzone z wykorzystaniem wektorów wirusowych wykazały szereg wad i ograniczeń m.in. obserwowano indukcję odpowiedzi immunologicznej, losową integrację transgenu z genomem gospodarza i/lub niską wydajność jego ekspresji. Dlatego, wciąż poszukuje się alternatywnych, skuteczniejszych i jednocześnie bezpieczniejszych metod transferu genów. Atrakcyjnej alternatywy upatruje się w metodach niewirusowych.

Cel pracy:

Przedstawienie wybranych metod niewirusowego transferu genów wykorzystywanych w terapii genowej chorób skóry.

Skrócony opis stanu wiedzy:

Terapia genowa chorób skóry obejmuje wykorzystanie wektorów plazmidowych jako nośnika genów terapeutycznych, a także metod ich dostarczania do komórek takich jak: elektroporacja, mikroiniekcja, sonikacja, wykorzystanie nośników lipidowych i polimerów kationowych.

Podsumowanie:

Niewirusowe metody transferu genów oferują pewne zalety włączając niską toksyczność, brak infekcyjności oraz łatwość i niskie koszty produkcji w porównaniu z technikami wirusowymi. Niewirusowe metody wydają się być obiecującym narzędziem terapii genowej chorób skóry w szczególności nowotworów tego narządu.

Słowa kluczowe: plazmid, transfer genów, skóra, wirus, terapia genowa.

Summary

Introduction:

Skin, the largest and most accessible organ of the human body is considered as an ideal gene therapy target. However, various types of viral vectors used in classical gene therapy have a number of disadvantages, such as possibility of immune response induction, random integration of inserts into the host genome or low expression efficiency. Therefore, there is an urgent need for alternative, non-viral methods of gene transfer.

Aim of the study:

To present methods for non-viral gene transfer used in gene therapy of skin diseases.

Short description of knowledge state:

Gene therapy for skin diseases include the usage of plasmid vectors as a carrier for therapeutic genes and different methods for their delivery into cells such as: electroporation, microinjection, sonication, lipid carriers and cationic polymers.

Summary:

Non-viral gene transfer methods offer some advantages including lower toxicity, non-infectious properties, ease of production and low costs as compared to viral techniques. Non-viral approaches are the promising tool in gene therapy of skin diseases, in particular in skin cancer ceases.

Key words: plasmids, gene transfer, skin, viruses, gene therapy.

Wprowadzenie

Skóra to największy i najbardziej dostępny organ ludzkiego ciała. Z racji łatwości wykonywania na niej wielu zabiegów np. iniekcji, przeszczepiania zmodyfikowanych genetycznie komórek, a także możliwości łatwego monitorowania przebiegu leczenia, stanowi niezwykle atrakcyjny cel dla omawianych w publikacji technik terapii genowej. Niewątpliwym atutem badań na skórze, jest także zadowalający profil bezpieczeństwa wprowadzanych w jej obrębie modyfikacji genetycznych, gdyż w razie niepowodzenia terapii lub wystąpienia skutków ubocznych, zmodyfikowane genetycznie komórki można relatywnie łatwo usunąć [1,2].

Terapia genowa jest uznawana jako potencjalnie skuteczne narzędzie w walce z wieloma chorobami. Po spektakularnym sukcesie, jakim było całkowite wyleczenie ciężkiego

złożonego niedoboru odporności związanego z chromosomem X (SCID-X1, ang. *Severe Combined Immuno Deficiency*) [3], wzbudzała ogromne nadzieje środowiska naukowego.

Wiele badań przedklinicznych wykazało imponujące wyniki w zakresie chorób skóry z wykorzystaniem zarówno strategii *ex vivo* i *in vivo*. Wskazywano, że techniki terapii genowej mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu ciężkich chorób genetycznych skóry, takich jak *epidermolysis bullosa*, czy *xeroderma pigmentosum*, wielu zmian nowotworowych skóry, jak również w poprawie procesu gojenia ran [4,5,6].

W podstawowych założeniach terapia genowa ma na celu leczenie przyczynowe chorób genetycznych. Polega to na wprowadzaniu obcego kwasu nukleinowego do komórek celem wywołania efektu terapeutycznego.

Ze względu na sposób działania wprowadzanego materiału genetycznego, terapia może wykazywać charakter: suplementacyjny, supresorowy i/lub samobójczy. W pierwszej z wymienionych strategii, do komórek nieposiadających określonego genu lub posiadających jego nieprawidłową kopię, wprowadza się sekwencje kodujące, które integrując się z genomem komórki prowadzą do przywrócenia jej prawidłowego funkcjonowania. W strategii supresorowej dostarczany do komórki materiał genetyczny ma na celu wyciszenie aktywności wadliwych i/lub nadaktywnych genów, najczęściej na poziomie DNA lub mRNA. W ramach tej strategii stosuje się antysensowne oligonukleotydy, małe interferujące cząsteczki RNA (siRNA, ang. *short interfering RNA*), rybozomy oraz aptamery. Z kolei celem samobójczej terapii genowej jest dostarczenie do wadliwie funkcjonujących komórek genu samobójczego, indukującego śmierć komórki w drodze apoptozy. Geny te kodują najczęściej enzymy, takie jak kinaza tymidynowa wirusa opryszczki, przekształcające nietoksyczne formy leków, tzw. proleki, do formy cytotoksycznej, której działanie ograniczone zostaje jedynie do frakcji komórek stransfekowanych. Podejście to znalazło zastosowanie głównie w próbach leczenia nowotworów [7,8,9].

Terapię genową możemy podzielić także ze względu na miejsce jej zastosowania na terapię *in vivo* i *ex vivo*. W terapii *in vivo* wadliwie funkcjonujące komórki transfekuje się wektorem *in situ* w organizmie gospodarza np. poprzez bezpośrednie nastrzyknięcie zmienionej nowotworowo tkanki. W podejściu *ex vivo* pobiera się tkanki od gospodarza, namnaża w kulturach *in vitro* i modyfikuje genetycznie poprzez transfekcję wektorem zawierającym gen terapeutyczny. Następnie, po wyselekcjonowaniu populacji zmodyfikowanych komórek, ponownie wprowadza się je do organizmu pacjenta [8,9].

Metodę dominującą w terapii genowej stanowi transfer genów w zastosowaniu wektorów wirusowych. Transfer tego rodzaju wykorzystuje naturalne zdolności wirusów do

infekowania komórek i wprowadzania do nich własnego materiału genetycznego. Najczęściej wykorzystywanymi wektorami wirusowymi są zmodyfikowane adenowirusy, reowirusy, lentiwirusy i modyfikowane wirusy opryszczki. Niestety wszystkie posiadają szereg wad, które w znaczący sposób ograniczają możliwość ich zastosowania. Najważniejsze z nich to wzbudzanie silnej odpowiedzi immunologicznej, krótkotrwała ekspresja genu terapeutycznego, losowa integracja z genomem gospodarza zwiększająca ryzyko mutacji insercyjnych, wysoka cytotoksyczność oraz nierzadko skrajnie mała pojemność [2,8,9].

W związku z wieloma ograniczeniami metod wirusowych opracowano strategie wykorzystujące wektory niewirusowe, np. plazmidy. Kolisty, dwuniciowe cząsteczki DNA, replikujące w komórkach docelowych niezależnie od genomu. Pozwalają na wysoce wydajną produkcję mRNA kodowanego transgenu w transfekowanych komórkach. W strukturze plazmidowego wektora ekspresyjnego poza wybranym transgenem obecne są:

1. Promotor - sekwencja wiążąca czynniki transkrypcyjne i polimerazę RNA. Zazwyczaj stosuje się wysoce efektywne promotory pochodzenia wirusowego; najczęściej pochodzące od wirusów: SV40 (*Simian Virus*), RSV (*Respiratory Syncytial Virus*) oraz CMV (*Cytomegalovirus*). Stosuje się również promotory swoiste tkankowo.
2. Polilinker (MCS, ang. *multi cloning site*) - sekwencja rozpoznawana przez enzymy restrykcyjne, która umożliwia wklejenie wybranego insertu w określone miejsce plazmidu.
3. Replikon - sekwencja pochodzenia bakteryjnego, która zawiera w sobie wszystkie elementy niezbędne do powielania plazmidu w komórkach bakteryjnych, w tym *ori* (miejsce startu replikacji). Decyduje o liczbie kopii cząsteczek plazmidu w danej komórce.
4. Gen oporności na antybiotyk - umożliwiający wyselekcjonowanie komórek transfekowanych. Najczęściej stosuje się geny oporności na ampicylinę lub kanamycynę.
5. Gen reporterowy - pozwalający na ocenę poziomu transfekcji, a także poziomu ekspresji transgenu. Najczęściej stosowanymi genami reporterowymi są: białko zielonej fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescent protein*) oraz gen β -galaktozydazy [2,8,9].

Powodzenie zarówno wirusowej jak i niewirusowej strategii transferu, uzależnione jest od wielu czynników. Bardzo istotne znaczenie ma zarówno wybór odpowiedniego genu terapeutycznego, zaprojektowanie wektora umożliwiającego stabilną, długotrwałą i wydajną ekspresję transgenu, jak również dobór jak najefektywniejszej metody dostarczenia wektora z insertem do komórek docelowych. Na przykład wydajność transferu genów za pośrednictwem adenowirusów jest w znacznej mierze uzależniona od występowania na powierzchni transdukowanych komórek receptorów adenowirusowych (CAR). Wiąże się to niską

skutecznością transdukcji komórek epitelialnych, więc szczególne nadzieje na leczenie chorób skóry pokłada się w metodach opartych na niewirusowym transferze genów [2,4,8,9].

Cel pracy

Przedstawienie wybranych metod niewirusowego transferu genów na przykładach terapii genowej chorób skóry.

Skrócony opis stanu wiedzy

Metody niewirusowego transferu genów do komórek skóry

Istnieje szereg metod fizycznych i fizykochemicznych wykorzystywanych w terapii genowej, które umożliwiają wydajne dostarczenie wektora do komórek skóry. Do najczęściej stosowanych metod fizycznych zalicza się: elektroporację, mikroiniekcję, wykorzystanie pistoletu genowego i sonikację. W przypadku metod fizykochemicznych wyróżnia się zastosowanie: polimerów kationowych, odczynników lipidowych, czy też białek penetrujących błonę komórkową [8,9,11,12]. Poniżej omówiono zasady działania wyżej wymienionych technik w kontekście terapii genowej chorób skóry.

Elektroporacja

Elektroporacja, zwana także elektopermabilizacją, wykorzystuje krótkie impulsy prądu elektrycznego (10 μ s-100ms) o wysokim napięciu (50-1500V/cm) w celu destabilizacji błony komórkowej i uformowania się porów, przez które do wnętrza komórki mogą przenikać relatywnie duże, egzogenne cząsteczki, takie jak DNA. Wydajność tego procesu jest zależna od składu błony komórkowej, wielkości i konformacji cząsteczki DNA, czasu trwania poszczególnych pulsów, jak również napięcia, jakie zostanie przyłożone do danej tkanki. W przypadku stosowania elektroporacji na potrzeby transferu genów, zastosowanie relatywnie dłuższych pulsów (20-60ms), przy niższym napięciu (700V/cm), skutkuje zwiększeniem skuteczności tej metody [9,10]. Elektroporacja jest obecnie jedną z najczęściej wybieranych technik fizycznych wprowadzania różnego rodzaju cząsteczek do żywych komórek. W przypadku plazmidowego DNA, zastosowanie tej metody zwiększa zarówno absorpcję jak i ekspresję wprowadzonych genów. W badaniach prowadzonych na komórkach skóry elektroporacja jest mało inwazyjna i na ogół dobrze tolerowana.

Ferraro i Lee z sukcesem wykorzystali elektroporację w swoich badaniach dotyczących śródskórnego transferu plazmidów kodujących czynniki wzrostu takie jak: VEGF, FGF-2 czy TGF- β do trudno gojących się ran w modelach mysich. Wzmożona ekspresja tych cząsteczek w znaczący sposób stymulowała angiogenezę i proliferację fibroblastów przyspieszając proces gojenia i bliznowacenia [13,4,15].

Szczegółowy protokół dostarczenia plazmidowego DNA do skóry świnek morskich przez elektroporację, uwzględniający natężenie pola elektrycznego, długość i szerokość impulsów oraz formułę plazmidowego DNA przedstawili także Broderick i wsp. [16].

Natomiast Lucas i Heller wykorzystując elektroporację wprowadzili plazmidy kodujące gen IL-12 do komórek czerniaka myszy doświadczalnych. Dzięki skutecznej transfekcji uzyskali całkowitą remisję guzów w niemal 80% przypadków [17,18]. Wyniki te pozwoliły na przeprowadzenie badań klinicznych I fazy, gdzie wykazali, iż wprowadzenie metodą elektroporacji genu dla IL-12, kodowanego na plazmidzie, po pierwsze skutkuje zmniejszeniem objętości i remisją transfekowanego guza, a po drugie regresją zmian oddalonych od miejsca wykonania procedury [19, 20].

Cha i Daud w roku 2012 również zastosowali plazmid kodujący IL-12 dostarczony *in vivo* bezpośrednio do komórek czerniaka. Wyniki doświadczeń potwierdziły skuteczność samej metody transferu jak i wpływ cytokiny na układową reakcję immunologiczną oraz całkowitą długotrwałą regresję guza. Zastosowanie opisanego transferu genów immunomodulujących cytokin wydaje się bardzo obiecującym podejściem ze względu na brak toksyczności ogólnoustrojowej związanej z ich dożylnym podaniem [21].

W 2015 roku Lamolinara i wsp. wykazali, że śródskórne zastosowanie impulsowego pola elektrycznego *in vivo* pozwala na jednoczesne dostarczenie odpowiedniej szczepionki do różnych typów komórek. Skutecznie permeabilizowane komórki znajdujące się we wszystkich warstwach skóry, migrowały do węzłów chłonnych wywołując pożądaną odpowiedź immunologiczną [22].

Wszystkie wspomniane wyżej badania wskazują że omawiana technika jest skuteczna, bezpieczna i mogłaby mieć zastosowanie w warunkach klinicznych. Dodatkowo, prowadzone są badania nad udoskonalaniem sprzętu do elektroporacji, celem zwiększenia dawek szczepionek transferowanych do komórek skóry [23].

Sonikacja

Zdecydowanie mniej popularną metodą w terapii genowej schorzeń dermatologicznych, jest sonikacja, która podobnie jak elektroporacja opiera się na

permeabilizacji błony komórkowej. Jednak, zamiast prądu elektrycznego, wykorzystuje fale ultradźwiękowe do wytworzenia porów w błonie komórkowej w obecności mikropęcherzyków powietrza, stabilizowanych przez różnego rodzaju polimery czy fosfolipidy. Mikropęcherzyki, podczas ekspozycji na ultradźwięki, pękają, tworząc niewielką falę uderzeniową, która sprzyja tworzeniu porów w błonie komórkowej, w konsekwencji ułatwiając dokomórkowy transfer DNA [24]. Metoda ta jest uznawana za bezpieczną i wydajną, została z powodzeniem zastosowana do transferu genów do komórek mięśnia sercowego i komórek tkanki kostnej [25,26]. Badaniami skóry, w 2009 roku zajęli się Gupta i wsp., zastosowali ultradźwiękowy system SonoPrep® do zwiększenia przepuszczalności skóry i szybkiego, bezinwazyjnego dostarczania środków znieczulających. Zaobserwowali, że sonikacja zwiększa przepuszczalność skóry dla leków przez dłuższy okres czasu (w szczególności pod wpływem okluzji) i dodatkowo może ułatwiać stałe przezskórne podawanie leków oraz diagnostykę ekstrakcji ich metabolitów [27].

Pistolet genowy

W próbach leczenia chorób skóry badacze wykorzystują także pistolet genowy (*ang. gene-gun*). Jest to metoda, u podstaw której leży opłaszczanie cząsteczek obojętnych metali, takich jak złoto czy wolfram, nagim DNA, a następnie rozpędzenie ich za pomocą odpowiednio skonstruowanego urządzenia tzw „pistoletu” do prędkości umożliwiających penetrację komórek tkanki docelowej. W zależności od zastosowanego urządzenia, efekt ten uzyskuje się przy pomocy oddziaływań magnetycznych, elektrostatycznych, bądź, co ma miejsce najczęściej, wysokiego ciśnienia gazów obojętnych (np. helu) [9,28]. Metoda ma szerokie zastosowanie w przypadku terapii genowej komórek skóry, w szczególności w strategiach obejmujących wprowadzanie genów samobójczych, szczepionek DNA, czy też immunomodulacji [2,9,29].

Xia i wsp. oceniali skuteczność techniki transferu plazmidu kodującego gen lucyferazy (Luc) do mysich komórek skóry i wątroby za pomocą pistoletu genowego Helios napędzanego helem (wykorzystano cząsteczki złota skonigowane z plazmidowym DNA o średnicy 1µm). Badacze określili ilość DNA optymalną dla pojedynczej cząsteczki mikronośnika oraz ujawnili znaczne różnice w kinetyce ekspresji genu Luc w zależności od tkanki (w skórze spadała szybciej). Wyniki te (szczególnie specyficzna tkankowo kinetyka ekspresji) powinny mieć kluczowe znaczenie w projektowaniu skutecznej terapii genowej z wykorzystaniem transferu „gene-gun” [30].

Efektywność pistoletu genowego sprawdzano także w próbach terapii nowotworów skóry. W 2013 roku Steitz i Tüting w mysim modelu czerniaka B16, zastosowali Helios gene-gun w celu transferu do komórek skóry plazmidu kodującego antygen różnicowania melanocytów (TRP2). Doświadczenie pokazało możliwość wyindukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej. Obserwowano produkcję przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom czerniakowym. Wyniki uzyskane przez zespół badaczy bez wątpienia stanowią punkt wyjścia dla terapii celowanych w inne antygeny [31].

Z kolei eksperyment przeprowadzony na modelu mysim przez Abe`a i Furumoto wykazał, że śródskórne podanie genu Flt3-ligand za pomocą pistoletu genowego do komórek włókniakomięsa zwiększał liczbę komórek dendrytycznych w rejonie transfekcji, co przekładało się na wydajniejszą prezentację antygenów nowotworowych limfocytom T. Bezpośrednim korzystnym efektem takiego działania był znaczący spadek odsetka proliferujących komórek nowotworowych i zmniejszenie masy oraz objętości guza [32].

Jakkolwiek technika „gene-gun” choć postrzegana za szybką i bezpieczną, to posiada również wady, do których zalicza się m. in. możliwość fragmentacji wprowadzanych cząsteczek DNA ze względu na działanie znacznych sił ścinających, jak również wysokie ryzyko dezintegracji docelowych komórek [28,33,34].

Mikroiniekcja

Rzadziej wykorzystywaną w ostatnim czasie fizyczną metodą transferu genów jest mikroiniekcja. Technika z zakresu mikrochirurgii, uważana za jedną z najmniej skomplikowanych i najszybszych metod wprowadzania genów do komórek. Istotą metody stanowi fizyczna penetracja błony komórkowej za pomocą mikropipety wyposażonej w szklaną mikroigłę. Mikropipeta posiada także urządzenie stabilizujące, co zapewnia wysoką precyzję i minimalizuje ryzyko uszkodzenia komórek podczas wstrzykiwania płynu z nagim DNA. Jednak, co stanowi niewątpliwym mankament tej metody, uzyskuje się stosunkowo niewielką ekspresję transferowanego genu. W celu jej zwiększenia rozważa się stosowanie środków wspomagających, w tym niejonowych polimerów, środków powierzchniowo czynnych oraz inhibitorów nukleaz [35,36].

Jak dotąd za pomocą mikroiniekcji, z sukcesem, udało się stransfekować komórki skóry, mięśni i wątroby [34,37]. Potencjalne zastosowanie metody w celu dostarczania genów do komórek skóry potwierdzili również Chabri, Coulman, Pearton [38,39,40]. Zespół naukowców zastosował w celu doskórnego transferu mikroigły opłaszczone plazmidowym (reporterowym) DNA. W pobranych wycinkach kontrolnych badano ekspresję transgeny.

Mimo sukcesu doświadczenia, autorzy podkreślają potrzebę dalszego badania właściwości rozpuszczalnego opłaszczonego DNA plazmidowego [40]. González-González i wsp. w swoich badaniach wskazali również na potrzebę wykorzystania nieinwazyjnych przyżyciowych metod obrazowania jako pomocy w udoskonalaniu i rozwoju technik mikroiniekcji. Za pomocą bioluminescencji obserwowano rozkład ekspresji genu reporterowego kodowanego przez plazmid wstrzyknięty do keratynocytów [41]. W 2013 roku Chong i wsp. przedstawili *proof-of-concept* dotyczący wyciszania genów za pomocą mikroigieł pokrytych małymi interferencyjnymi cząsteczkami RNA (siRNA) [42]. Próbowano też zastosować odmianę mikroiniekcji ze strzykawką bezigłową (ang. *Jet Iniection*) gdzie strumień roztworu DNA napędzany jest przez aparat wykorzystujący sprężony dwutlenek węgla. Przeprowadzono transfer genów do komórek raka skóry jako rozwiązanie suplementujące chemioterapię [43].

Odczynniki lipidowe

Zupełnie odrębną grupę technik niewirusowego transferu genów stanowią metody fizykochemiczne zakładające zastosowanie specyficznych nośników tworzonych na bazie syntetycznych związków chemicznych lub wysoko oczyszczonych substancji naturalnych.

Jednym z typów w/w nośników są odczynniki kationowe. Tworzą one sferyczne, dwuwarstwowe struktury lipidowe, które ze względu na swój hydrofobowy charakter mogą integrować się z błoną komórki, przenosząc jednocześnie do jej wnętrza materiał genetyczny [9,44]. Szczególną odmianą nośników tego rodzaju są lipidy kationowe, zbudowane z dodatnio naładowanej „głowy” wiążącej ujemnie naładowane reszty fosforanowe kwasów nukleinowych oraz hydrofobowych zakończeń w postaci alifatycznych łańcuchów. Taka budowa pozwala na uformowanie tzw. lipopleksu, w którym ujemnie naładowane cząsteczki kwasów nukleinowych zamknięte są w dodatnio naładowanym wnętrzu hydrofobowej sfery, co nie tylko umożliwia efektywne przejście przez błonę komórkową, ale również chroni przenoszony materiał genetyczny przed działaniem środowiska zewnętrznego, w szczególności przed aktywnością nukleaz zdolnych do jego degradacji [45]. Bardzo często lipidy kationowe poddaje się różnym modyfikacjom chemicznym, takim jak opłaszczenie glikolem polietylenowym (PEG, ang. *Polyethylene Glycol*), co ma na celu zarówno wydłużenie czasu ich półtrwania, jak również zmniejszenie ryzyka wystąpienia odpowiedzi immunologicznej ze strony organizmu gospodarza [46].

Polimery kationowe są zdolne, podobnie jak kationowe lipidy, do wiązania ujemnie naładowanych cząsteczek kwasów nukleinowych i przenoszenia ich przez błony komórkowe.

Jednakże połączenie to jest znacznie stabilniejsze, a wypadkowy ładunek całego kompleksu jest zbliżony do obojętnego, co znacząco zmniejsza niepożądane z punktu widzenia transferu genów oddziaływanie z białkami osocza i/lub macierzy zewnątrzkomórkowej [47]. Najczęściej wykorzystywanym polimerem kationowym jest polietyloimina (PEI, *ang. polyethylenimine*), która może występować w formie liniowej i rozgałęzionej. Postać liniowa cechuje się znacznie mniejszą toksycznością i wyższą wydajnością transfekcji niż forma rozgałęziona, dlatego wydaje się być atrakcyjniejsza dla zastosowań *in vivo* [47,48,49].

Shanmugam i wsp. wykazali, że przepływ leku przez skórę jest bardziej wydajny i stabilny przy zastosowaniu liposomów kationowych, a w następnej kolejności anionowych i obojętnych liposomów [50]. Carrer i wsp. zwracają uwagę że stężenia lipidów stosowanych do formowania liposomów mogą mieć istotny wpływ na przepuszczalność skóry. Liposomy utworzone z bardziej skoncentrowanych lipidów mniej efektywnie penetrują błonę komórkową w porównaniu do tych z mniejszą koncentracją, które mogą swobodnie przenikać przez granicę naskórka i skóry [51].

W terapii genowej chorób skóry przedstawione powyżej nośniki także znalazły zastosowanie. Matsumoto i wsp. użyli liposomów kationowych do transfekcji komórek czarniaka plazmidem kodującym ludzki IFN-beta. Wyniki wykazały zwiększone naciekanie komórek T CD4⁺ wokół komórek czarniaka zlokalizowanych w skórze właściwej, choć były to pojedyncze reakcje. Nie odnotowano skutków ubocznych terapii, jednak jej skuteczność nie była zadowalająca. Taka strategia, pod warunkiem wprowadzenia zmian, może okazać się potencjalnie skutecznym narzędziem w leczeniu różnych nowotworów, w tym czarniaka [52].

Liu i wsp. zastosowali PEI o niższej masie molekularnej (LMW-PEI) do transfekcji plazmidem kodującym białko GFP. Efektywność transfekcji badano w komórkach linii CM7721 i w skórze myszy. Wyniki wykazały transfekcję na poziomie 55%, ponadto odnotowano, że ze wzrostem masy cząsteczkowej PEI, wzrastała cytotoksyczność co powodowało spadek efektywności transfekcji. Jednak, zastosowanie LMW-PEI w transferze genów wydaje się być interesującą alternatywą [53].

W 2012 roku Jan i wsp. także badali skuteczność polietyloiminy w transferze plazmidu kodującego odwrotną transkryptazę ludzkiej telomerazy (hTERT) do komórek macierzystych mieszków włosowych. Wyniki doświadczenia były zadowalające, znacząco zwiększyła się proliferacja komórek po transfekcji, a ok. 15 dni od wykonania procedury komórki mieszków włosowych wchodziły w fazę anagenu, podczas gdy komórki nietransfektowane pozostawały w fazie telogenu [54].

CPP

Ostatnią z metod transferu genów wartą uwagi jest wykorzystanie białek penetrujących komórki (CPP, *ang. cell penetrating proteins*), zwanych także białkowymi domenami transdukcijnymi (PTD, *ang. protein transduction domains*). Cechą charakterystyczną tych białek jest zdolność do niezwykle szybkiego przenikania przez błony komórkowe. Wynika to z ich specyficznego składu aminokwasowego (przewaga aminokwasów zasadowych, głównie lizyny i argininy) [55]. Z powodu dodatniego ładunku jaki posiadają, CPP są zdolne wiązać kwasy nukleinowe, a sam transport do wnętrza komórki zachodzi na drodze licznych, oddziaływań pomiędzy cząsteczką białka, a elementami błony komórkowej [56]. Główną zaletą przemawiającą za stosowaniem białek przenośnikowych jest brak toksyczności wynikający z działania opartego na procesach aktywnego transportu przez błonowego (m.in. na endocytozie czy makropinocytozie) oraz ich niezależność od występowania na powierzchni komórek odpowiednich receptorów [57,58].

Jako pierwszy Rothbard et al. w 2000 roku opisał zastosowanie CPP do dostarczania peptydów do skóry. Wykazał, że peptyd R7 (poliarginina-7) sam może przekroczyć barierę skóry właściwej, a głębokość i natężenie penetracji skóry zależy od długości i stężenia stosowanego peptydu [59].

Johnson i wsp. w 2010 roku wykazali potencjalne zastosowanie nowego białka penetrującego komórki POD (*peptide for ocular delivery*) w transferze genów do komórek skóry. Kompleks białek POD-GFP zlokalizowano w naskórku myszy doświadczalnych, jednak nie w komórkach skóry właściwej. Niemniej jednak, wstępne wyniki zachęcają do dalszych badań z użyciem białka POD [60].

Podsumowanie

Niewirusowe metody transferu genów zostały opracowane w celu ominięcia komplikacji związanych z zastosowaniem wektorów wirusowych. Techniki te różnią się znacznie pod względem skuteczności transfekcji i toksyczności. W ciągu ostatnich lat opracowano wiele nowych niewirusowych sposobów dostarczania genów terapeutycznych, w szczególności w zakresie metod chemicznych jak również zastosowań metod fizycznych *in vivo*. Efektywność niewirusowego transferu genów jest nadal niższa od wysoko wydajnych wektorów wirusowych. Z kolei liczne badania potwierdzają korzystniejszy profil bezpieczeństwa oraz znacznie niższe koszty i łatwiejszą produkcję, względem metod z wykorzystaniem nośników wirusowych.

Niewirusowy transfer genów terapeutycznych niezaprzeczalnie prezentuje jeden ze sposobów potencjalnie skutecznej terapii chorób skóry, ale aktualny stan wiedzy sugeruje konieczność ciągłego udoskonalania dostępnych metod.

References

1. Abdul-Wahab A, Qasim W, McGrath JA. Gene therapies for inherited skin disorders. *Semin Cutan Med Surg.* 2014; 33(2): 83-90.
2. Chira S, Jackson CS, Oprea I et al. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget,* 2015; 13: 30675-703.
3. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288: 669-72.
4. Setoguchi Y, Jaffe HA, Danel C et al. Ex vivo and in vivo gene transfer to the skin using replication-deficient recombinant adenovirus vectors. *J Invest Dermatol.* 1994; 102: 415-421.
5. Heller LC, Heller R. In vivo electroporation for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2006; 17: 890–897.
6. Nakanishi K, Uenoyama M, Tomita N et al. Gene transfer of human Hepatocyte Growth Factor into rat skin wounds mediated by liposomes coated with the Sendai Virus (Hemagglutinating Virus of Japan), *Am J Pathol.* 2002; 16: 1761-72.
7. Greco R, Oliveira G, Stanghellini MT et al. Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene. *Front Pharmacol* 2015; 6:95.
8. Jakóbiśiak M. Perspektywy terapii genowej. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2009; 77: 289–293
9. Szala S. *Terapia genowa*, PWN, Warszawa 2003.
10. Grubb BR, Pickles RJ, Ye H et al. Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans. *Nature.* 1994; 371: 802-806.
11. Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand,* 2003; 177: 437-447.
12. Rabussay D, Dev NB. Enhancement of therapeutic drug and DNA delivery into cells by electroporation. *J Phys D: Appl Phys.* 2003; 36: 348-363.
13. Ferraro B, Cruz YL, Baldwin M et al. Increased perfusion and angiogenesis in a hind limb ischemia model with plasmid FGF-2 delivered by noninvasive electroporation. *Gene Ther.* 2010; 17: 763–769.
14. Ferraro B, Cruz YL, Coppola D et al. Intradermal delivery of plasmid VEGF(165) by electroporation promotes wound healing. *Mol Ther.* 2009; 17: 651–657.
15. Lee PY, Chesnoy S, Huang L. Electroporatic delivery of TGF-beta1 gene works synergistically with electric therapy to enhance diabetic wound healing in db/db mice. *J Invest Dermatol.* 2004; 123: 791–798.
16. Broderick KE, Khan AS, Sardesai NY. DNA vaccination in skin enhanced by electroporation. *Methods Mol Biol.* 2014; 1143: 123-130.
17. Lucas ML, Heller L, Coppola D, Heller R. IL-12 plasmid delivery by in vivo electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma. *Mol Ther.* 2002; 5: 668–675.
18. Lucas ML, Heller R. IL-12 gene therapy using an electrically mediated nonviral approach reduces metastatic growth of melanoma. *DNA Cell Biol.* 2003; 22: 755–763.
19. Daud AI, DeConti RC, Andrews S et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 5896–5903.
20. Heller LC, Heller R. Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma. *Curr Gene Ther.* 2010; 10(4): 312-317.
21. Cha E, Daud A. Plasmid IL-12 electroporation in melanoma. *Hum Vaccin Immunother.* 2012; 8(11): 1734–1738.
22. Lamolinara A, Stramucci L, Hysi A et al. Intradermal DNA Electroporation Induces Cellular and Humoral Immune Response and Confers Protection against HER2/neu Tumor. *J Immunol Res.* 2015; 2015: 159-145.

23. McCoy JR, Mendoza JM, Spik KW et al. A multi-head intradermal electroporation device allows for tailored and increased dose DNA vaccine delivery to the skin. *Hum Vaccin Immunother.* 2015; 11(3): 746-754.
24. Endoh M, Koibuchi N, Sato M et al. Fetal gene transfer by intrauterine injection with microbubble-enhanced ultrasound. *Mol Ther.* 2002; 5: 501-508.
25. Tsunoda S, Mazda O, Oda Y et al. Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 336: 118-127.
26. Sheyn D, Kimelman-Bleich N, Pelled G et al. Ultrasound-based nonviral gene delivery induces bone formation in vivo. *Gene Therapy.* 2008; 15: 257-266.
27. Gupta J, Prausnitz MR. Recovery of Skin Barrier Properties after Sonication in Human Subjects *Ultrasound Med Biol.* 2009; 35(8): 1405–1408.
28. Lin MT, Pulkkinen L. The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy. *Int J Dermatol.* 2000; 39: 161-170.
29. Porowińska D, Wujak M. Prokariotyczne systemy ekspresyjne. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013; 67: 119-129.
30. Xia J, Martinez A, Daniell H, Ebert SN. Evaluation of biolistic gene transfer methods in vivo using non-invasive bioluminescent imaging techniques. *BMC Biotechnol.* 2011; 11: 62.
31. Steitz J, Tüting T. Biolistic DNA vaccination against melanoma. *Methods Mol Biol.* 2013; 940: 317-337.
32. Abe A, Furumoto H, Yoshida K, et al. Gene gun-mediated skin transfection with FL gene suppresses the growth of murine fibrosarcoma. *J Med Invest.* 2011; 58: 39-45.
33. Wang S, Joshi S. Delivery of DNA to skin by particle bombardment. *Methods Mol Biol.* 2004; 245: 185-196.
34. Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene therapy.* 2002; 9: 1647-1652.
35. Sato Y, Yamauchi N, Takahashi M et al., In vivo gene delivery to tumor cells by transferring – streptavidin–DNA conjugate, *Faseb Journal.* 2000; 14: 2108-18.
36. Greco O, Scott SD, Marples B, Dachs GU. Cancer gene therapy: delivery, delivery, delivery. *Frontiers in Bioscience.* 2002; 7: 1516-1524.
37. Eriksson E, Yao F, Svensjo T et al. In Vivo Gene Transfer to Skin and Wound by Microseeding. *J Surg Res.* 1998; 78:85-91.
38. Chabri F, Bouris K, Jones T et al. Microfabricated silicon microneedles for nonviral cutaneous gene delivery. *Br J Dermatol.* 2004; 150(5): 869-877.
39. Coulman SA, Barrow D, Anstey A et al. Minimally invasive cutaneous delivery of macromolecules and plasmid DNA via microneedles. *Curr Drug Deliv.* 2006; 3(1): 65-75.
40. Pearton M, Saller V, Coulman SA et al. Microneedle delivery of plasmid DNA to living human skin: Formulation coating, skin insertion and gene expression. *J Control Release.* 2012; 160(3): 561-569.
41. González-González E, Kim YC, Speaker TJ et al. Visualization of plasmid delivery to keratinocytes in mouse and human epidermis. *Sci Rep.* 2011; 1: 158.
42. Chong RH, Gonzalez-Gonzalez E, Lara MF et al. Gene silencing following siRNA delivery to skin via coated steel microneedles: In vitro and in vivo proof-of-concept. *J Control Release.* 2013; 166(3): 211-209.
43. Stein U, Walther W, Stege A et al. Complete in vivo reversal of the multidrug resistance phenotype by jet-injection of anti-MDR1 short hairpin RNA-encoding plasmid DNA, *Molecular Therapy.* 2008; 16: 178-186.
44. Blume G, Cevc G. Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1990; 1029: 91-97.
45. Wasungu L, Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release.* 2006; 116: 255-64.
46. Harvie P, Wong FM, Bally MB. Use of poly(ethylene glycol)– lipid conjugates to regulate the surface attributes and transfection activity of lipid DNA particles. *J Pharm Sci.* 2000; 89: 652-663.
47. Fischer D, Bieber T, Li Yet al. A novel nonviral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res.* 1999; 16: 1273-1279.
48. Gosselin MA, Guo W, Lee RJ. Efficient gene transfer using reversibly cross-linked low molecular weight polyethylenimine. *Bioconjug Chem.* 2001; 12: 989-994.

49. Goula D, Benoist C, Mantero S et al. Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Therapy*. 1998; 5: 1291-1295.
50. Shanmugam S, Song CK, Nagayya-Sriraman S et al. Physicochemical characterization and skin permeation of liposome formulations containing clindamycin phosphate. *Arch Pharm Res*. 2009; 32(7): 1067-1075.
51. Carrer DC, Vermehren C, Bagatolli LA. Pig skin structure and transdermal delivery of liposomes: a two photon microscopy study. *J Control Release*. 2008; 132(1): 12-20.
52. Matsumoto, K, Kubo H, Murata H et al. A pilot study of human interferon beta gene therapy for patients with advanced melanoma by in vivo transduction using cationic liposomes. *Jpn J Clin Oncol*. 2008; 38(12): 849-56.
53. Liu YJ, Zhang AN, Xue XP. Study on the application of PEI for gene transfer in mouse skin tissue. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2007; 23(1): 166-170 [abstract].
54. Jan HM, Wei MF, Peng CL et al. The use of polyethylenimine-DNA to topically deliver hTERT to promote hair growth. *Gene Ther*. 2012; 19(1): 86-93.
55. Trabulo S, Cardoso AL, Mano M et al. Cell-Penetrating Peptides –Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals*. 2010; 3: 961-993.
56. Zorko M, Langel U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; 57: 529-45.
57. Sawant R, Torchilin V, Raagel H et al. Intracellular transduction using cell-penetrating peptides. *Mol BioSyst*. 2009; 6: 628-640.
58. Fonseca SB, Pereira MP, Kelley SO. Recent advances in the use of cell penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009; 61: 953-964.
59. Rothbard JB, Garlington S, Lin Q et al. Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med*. 2000; 6(11): 1253-1257.
60. Johnson LN, Cashman SM, Parker Read S, Kumar-Singh R. Cell Penetrating Peptide POD Mediates Delivery of Recombinant Proteins to Retina, Cornea and Skin. *Vision Res*. 2010; 50(7): 686–697.