

Biharko txertoak:

ADN txertoak ote?

Adelaida Umanan¹ & Arantxa Sarasua²



ADN txertoak ADN molekula biribilak dira. Molekula hauetan mikroorganismo patogeno baten gene batzuk daude eta hauen transkripziorako sekuentzia eragileak ere bai.

Ugaztunen zeluletan txertaturik ez dira erreplikatu eta orain arte egindako ikerketen arabera ez dira kromosometan integratu. Aldiz, kodifikatzen dituzten antigeno mikrobianoak adieraziko dira erantzun inmune espezifikoa bultzatuz.

Hau guztia txertorik ez zuten infekzio batzuekin lortu da eta oraingoz animaliekin soilik frogatu da ADN txerto hauen erabilgarritasuna.

Dena den teknologia honen aplikazio nagusia mikroorganismoen antigeno babesleak bilatzea da nahiz eta gero antigeno hauek beste modutan txertatu.

Zer dira txertoak? Erantzun inmune espezifikoa bultzatzen duten elementuak direla esanaz erantzun daiteke. Txertoen molekulak "antigeno" izena hartzen dute eta patogenoak ez izan arren, mikroorganismo patogenoen moduan erantzun defentsibo espezifikoa bultzatzen dute, baina gaixotasunik eragin gabe. Lehenengo txertoen antigenoak mikroorganismo osoak ziren, bizirik zeudenak, baina motelduak edo hilak. Baztanga, elgorria edo kukutxetula txerto hauek erabiliz kontrolatu dira. Oso txerto eraginkorrak izan dira eta hauetako batzuk oraindik ere erabiltzen

dira, nahiz eta mikroorganismo bakoitzaren antigenoak zehatz-mehatz ez ezagutu. Txerto biziak hilak baino eraginkorragoak dira, baina beraien akats nagusia seguritatez eza da. Moteltzeko prozesuan erroreak gertatzen badira edo immunoeskasia dutenekin erabiltzen bada, txertoak gaixotasuna eragiteko arriskua dago.

Gaixotasun zehatz baten kasuan erantzun babeslea bultzatzen duten antigenoak identifikatu ondoren proteina antigenikoz osaturiko txertoak egin daitezke. Meningitisa, tetanoa edo difteria kontrolatzeko honelako txertoak erabili izan dira. Antigeno proteikoak purifikatu ahala arriskuak gutxitu egin

dira, baina batzuetan eraginkortasuna galdu ere egin da. Bestalde mikroorganismo askok euren antigenoak ezkutatzeko edo aldatzeko gaitasuna garatu dute.

Arazo hauek guztiak gainditzeko berriro sinpletasuna bilatu behar da eta horretarako jatorrirra joatea baino ez dago; antigenoak kodifikatzen dituzten geneak identifikatu, ebaki eta hauek zuzenean txertatu. Honela, ADN txertoak jaio dira. ADN hori plasmido moduan dago, hau da molekula biribila da, eta txertoa hartzen duten ugaztunen zeluletan ez da bikoiztuko baina kodifikatzen dituzten proteina kanpotarrak sintetizatu eta adierazi egingo dira.

OSASUNA

Hau guztia txertorik ez zuten infekzio batzuekin lortu da eta oraingoz animaliekin soilik frogatu da ADN txerto hauen erabilgarritasuna. Lehenengo irudian 5 urte baino gutxiagoko umeak hiltzen dituzten gaixotasun infekziosoak agertzen dira. Ikusten denez txerto berri asko egiteke dago eta ADN txerto berri hauek hutsune hori betetzeko balio dezakete.

ADN txertoen abantailak

Erantzun immune zelularra pizten dute

Birusengatiko infekzioak beti zelulabarruko infekzioak dira; malaria sortzen duen parasittoa eta beste protozoo batzuk ere zelularen barruan bizi dira. Ostalariaren zelulen barruan dauden bitartean antigorputzek ezin diete kalterik egin holako parasitoei; antigorputzek zelula batetik bestera joaterakoan soilik blokea ditzakete. Infektatutako zelulak detektatzeko zein desegiteko erantzun immune zelularra bultzatu behar da, TD 8+ linfzito zitotoxikoen eta makrofagoen aktibazioa, besteak beste.

ADN txertoak mikroorganismo baten antigeno batzuk kodifikatzen dituzten geneak ditu, birus

baten geruzako proteina bat adibidez. Ostalariaren zelulak atzerriko ADN a barneratu eta bere zitoplasman birusaren proteina eratuko du. Berezko proteinak balira bezala, ostalariaren zeluletan histokonpatibilitate konplexu nagusiaren I klaseko molekulek proteina birikoaren peptidoak zelulen mintzetaraino eramango dituzte (2. irudia). Honela aurkeztuak CD8+ T linfzitoak eragingo dituzte, beraz, beste txertoak ez bezala, erantzun immune zelularra piztuko dute⁵.

Proteinazko txertoak aldiz, fagozitosiaren bidez behin zelulen barruan egonez gero histokonpatibilitate konplexu nagusiaren II klaseko molekulekin batera agertuko dira mintzetan. Aurkezpen-mota honek antigorputzen erantzuna piztuko du gehien bat, CD4+ linfzitoen bidez. Gainera, antigenoak aurkezteko bide endogeno hau erabiliz, beste teknikekin baino epitopo gehiago adierazten dira inmunitate handiagoa lortuz⁸.

ADN txertoek eragiten duten erantzunaren beste ezaugarri bat 1 motako T linfzito laguntzaile asko sortzea da. Hauen bidez makrofagoak aktibatu egingo dira eta oso erantzun eraginkorra lortuko da, bizirik geratzen diren bakte-

rioak, *Mycobacterium tuberculosis* edo *Listeria monocytogenes* besteak beste, makrofagoen barruan suntsitzeko.

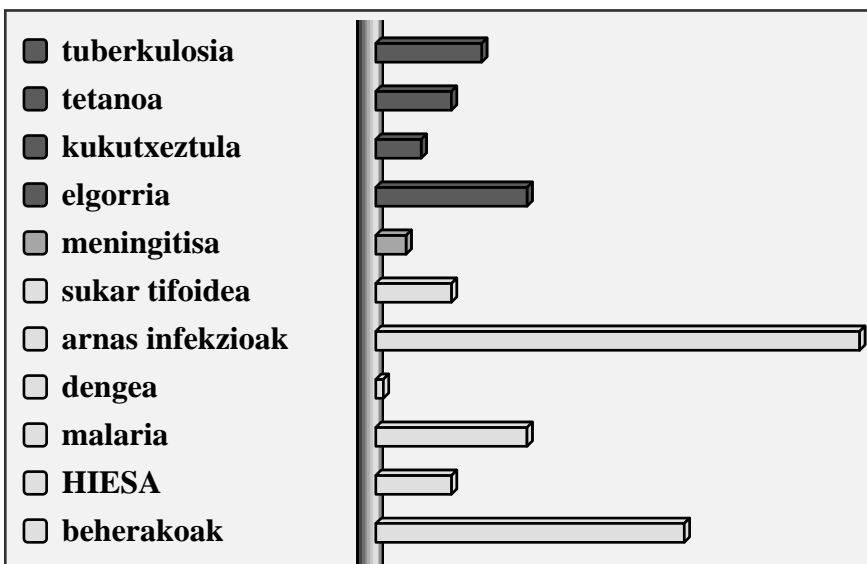
Dena den, txerto hauek eragindako erantzuna gehien bat zelularra izan arren, ADN exogenoak mitogeno gisa jokatzen du B zelulak aktibatuz eta antigorputzen erantzuna bultzatuz³.

Bektorerik ez da behar

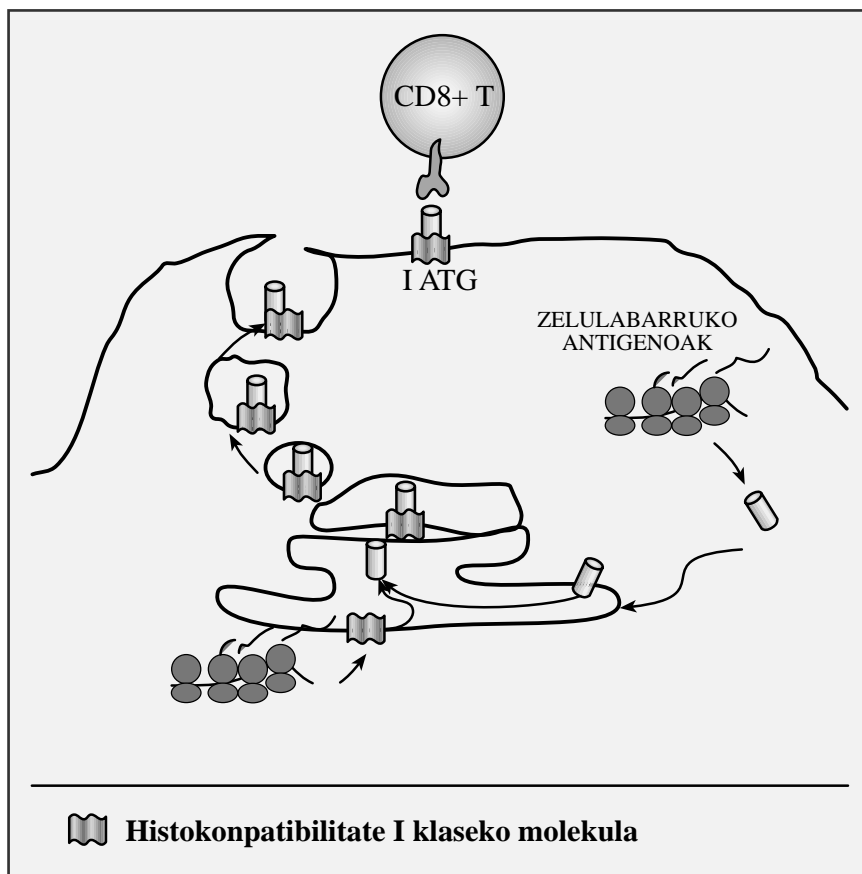
ADN txertoen beste abantaila bat garraiorik behar ez izatea da; ADN a biluzik erabiltzen da plasmido moduan. Plasmidoak bakterio baten barruan berez bikoizteko gai diren ADN molekula zirkularrak dira; aldiz, ugaztunen zeluletan ez dira bikoiztuko baina daramatzaten geneak transkribatzeko beharrezko elementuak dituzte. Beraz, erantzun immunea eragiteko, aukeratu dugun genea plasmidoan erantsita txertatzen da zuzenean muskuluetan, alegia bektorerik erabili gabe. Han transkribatuko da eta gero erribosometan ARNa itzuliko da proteinetan. Orain arte geneak transferitzeko frogatu diren sistema guztiak bektoreak erabili behar zituzten, hau da, aukeratutako genea birus baten genomari sartzen zen eta azken birus hau, bektorea hain zuzen, txertatzen zen ostalariaren muskuluetan. Alde batetik zaila da bektore egoki bat aurkitzea edozein gene-mota garraiatzeko eta beste aldetik bektorearengatiko ondorengo kalteak beti izaten dira arriskutsuak.

Epitopoak diren bezala eratu

Erantzun immunea bultzatzeko erabiltzen diren antigenoek mikroorganismoen proteinen zati batzuen forma tridimentsionala ahalik eta zehatzen mantendu edo imitatu behar dute. Bestela txertoen eraginez eraturako antigorputzak eta T zelulen hartzaileak ez dira behar bezain ondo lortuko. Mikroorganismoek, motel-tzeko edo inaktibatuzko prozeduran, askotan aldatzen dute protei-



1. irudia. 5 urtetik beherako umeen hilortasunaren eragileak (ilunenak —lehen laurak— soilik dute txertoa).



Histokonpatibilitate I klaseko molekula

2. irudia. Antigenoen prozesamendua eta aurkezpena bide endogenotik.

nen egitura eta ondorioz antigenizitatea galtzen da. ADN txertoen kasuan mikroorganismoaren proteina zelularen barruan erazten da eta inolako aldaketarik gabe aurkezten zaio sistema immuneari; beraz epitopoen osotasuna hobeto mantentzen da eta sortutako erantzuna eraginkorragoa izango da.

Konjugatzeko erraztasuna

Txerto berriak txertaketa-egutegian sartu ahala gero eta konplikatuagoa bihurtuko da txertaketen erabilera mantentzea. Horren soluzioa antigeno desberdinak denak batera txertatzea izango litzateke baina antigeno hauek proteikoak baldin badira, eta batez ere dosi handitan erabili behar badira, guztiak batera txertatzea ez da posible izango.

ADN txertoen bidez, teoriarik behintzat, mikroorganismo patogeno desberdinen geneak bata bestearen ondoan jarrita plasmido

do batean ezartzea erraza izango litzateke. Edozein kasutan ere, ADN bakoitzak kodifikatzen dituen proteinak konjugatzea baino errazagoa izango da beti.

Mikroorganismo baten zepa mutante guztien kontrako immunitatea lortzen da

Birus batzuk, gure erantzun immunea ekiditeko, noizbehinka beraien azaleko antigenoak aldatzen dituzte mutante edo serotipo berriak sortuz. Honela nahiz eta serotipo baten kontra immunitatea garatu, beste serotipo mutanteren bat agertzen denean gure defentsak baliogabeak dira. Hau da, adibidez, gripearekin gertatzen dena, txertoa antigeno proteikoaz eratzen denez, serotipo bakar batentzat balio du eta gripearen aurkako txertaketa urtero errepikatu behar da. Ikertzaile batzuk gripearen birusarekin lan eginez serotipo desberdinen aurka animaliei babesema ematen dien ADN txerto berri bat lortu

dute¹⁴. Dirudienez txerto honen eraginez agertzen diren T linfotok zitotoxikoak aldatzen ez diren barruko proteina antigenoekin lotzen dira. Baina immunitate hori lortzeko antigeno hauek bide endogenoaren bidez aurkeztuta egon behar dute. Beste ikertzaile-talde batzuek ADNaren bidez papiloma birusaren serotipo guztien kontrako txerto bat lortu dute eta II motako herpes birusaren kontra ere beste txerto berria frogatu da animaliekin^{2,4}.

Ume txikientzat ere immunogenoak dira

Gaixotasun infekziosoak prebenitzeko ume txikiak babestu behar izaten ditugu maiz, eta talde honen erantzuna eskasa da. Garatu gabeko sistema immuneak erantzun nahikoa emateko erantzun zelularra gogor bultzatzen dituzten sistemak erabili behar dira. Horretarako ADN txertoek abantaila teorikoa badute.

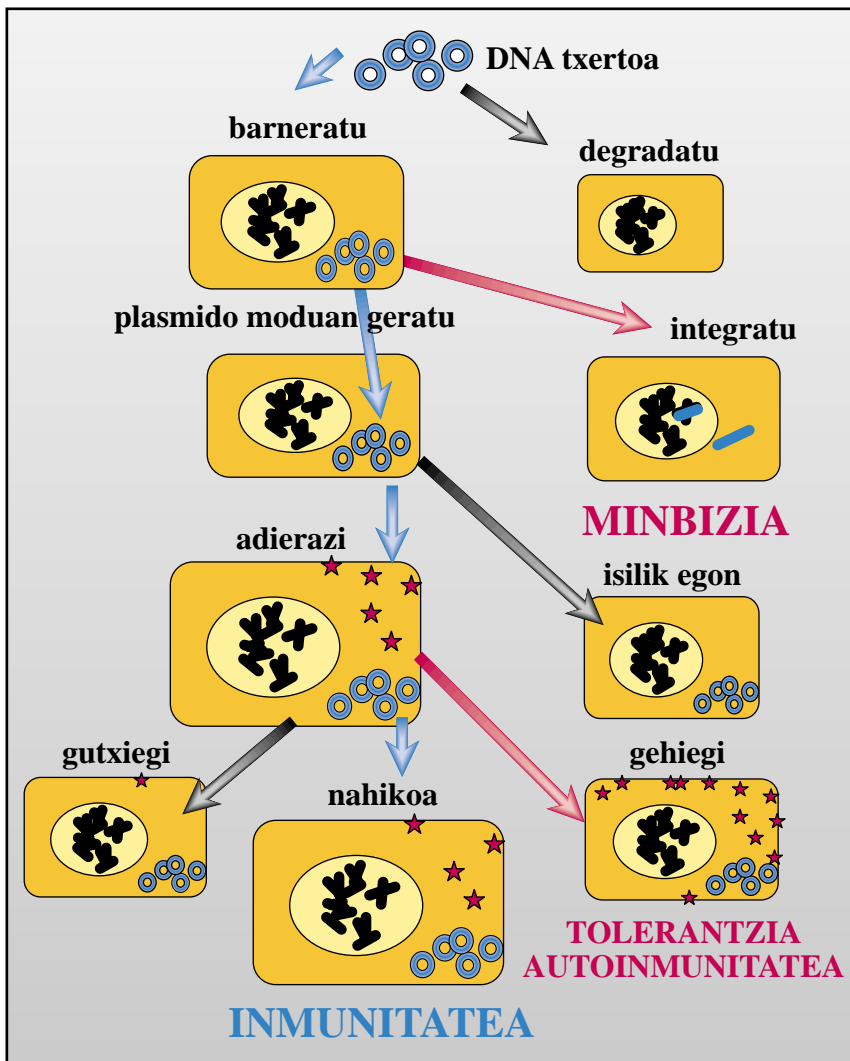
Bestalde, elgorriaren kasuan, adibidez, amagandik hartutako antigorputzek ostopatu egiten dute mikroorganismo biziz egindako txertoen eragina. ADN txertoak arazo hori gaitzitzen du, ziur.

Gainera ADN txertoak, beste txerto hilak bezalaxe, txerto biziak baino seguruagoak izango dira immunoeskasiaren aurrean. Bestalde, munduko leku askotan erabiltzeko ere, errazagoak izango dira, proteinak ez bezala termoezgarriak direlako.

ADN txertoen arriskuak

Minbizia sortarazi?

Kanpoko ADNaren gure kromosometan sartzeko kapaza al da? Hala bada akabo ADN txertoak! Horrek ekarriko lituzkeen mutazioek gure zeluletako erregulazio-prozesu guztiak aldatu eta prebenitu nahi dugun kaltea baino handiagoak eragingo lituzkete (minbizia, besteak beste).



3. irudia. Txertatutako ADN plasmidikoak jarrai ditzakeen ibilbideak.

Tolerantzia edo autoinmunitatea eragin

Behin genea sartuz gero, eta gure kromosometan sartzen ez dela onartuta, noiz arte sintetizatuko da geneak kodifikatzen duen antigenoa? Denbora luzez baldin bada baliteke ostalaria antigeno honen aurrean tolerantzia bihurtzea eta, ondorioz, infekzioa gertatzean ez luke erantzungo. Beste posibilitatea da autoinmunitate-fenomenoak bultzatzea, kontuan hartuta antigeno hori gure zeluletan ari dela adierazten gure histokonpatibilitate konplexu nagusiaren molekulekin batera, eta multzo horrek erantzun zitotoxiko espezifiko bultzatzen duela. Egoera hau luzaro mantentzean ostalariaren ehunetan autoinmunitate-

agatik kalteak somatzea ez litza-teke arraroa izango.

Dena den, orain arte frogatutako kasuetan badirudi antigeno arrotzen adierazpen aldia egokiena dela erantzuna eraginkorra izateko eta oroimeneko zelula espezifikoko nahikoak agertzeko, baina ez tolerantzia edo autoinmunitatea sortzeko adinakoa⁷ (3. irudia).

Egungo egoera eta geroko lanak

Txerto berriak eratzeko bide orokorra

Datozen urteotan ADN txertoen teknologia berri honek erraztuko du, bereziki, txertoen eraketa. Mikroorganismo batzuk antigenikoki oso konplexuak direnez, aipatu

dugun teknologia, kasu bakoitzean, erantzun babeslea bultzatzen duen antigenoak identifikatzeko erabil dezakegu. Horretarako soilik erabiltzen bada ere merezi du, nahiz eta gero beste sistema erabili antigeno hauek sistema immuneari aurkezteko⁹. ADN txertoak egiteko genotekak erabiltzea eta antigeno egokienak aukeratzea metodo orokorra izan daiteke edozein motatako txertoa egiteko. Teknologia hau, besteak beste, *Mycoplasma* generoko bakterioen antigenorik interesgarrienak aukeratzeko erabili izan da¹.

ADNa txertatzeko beste bideak landu

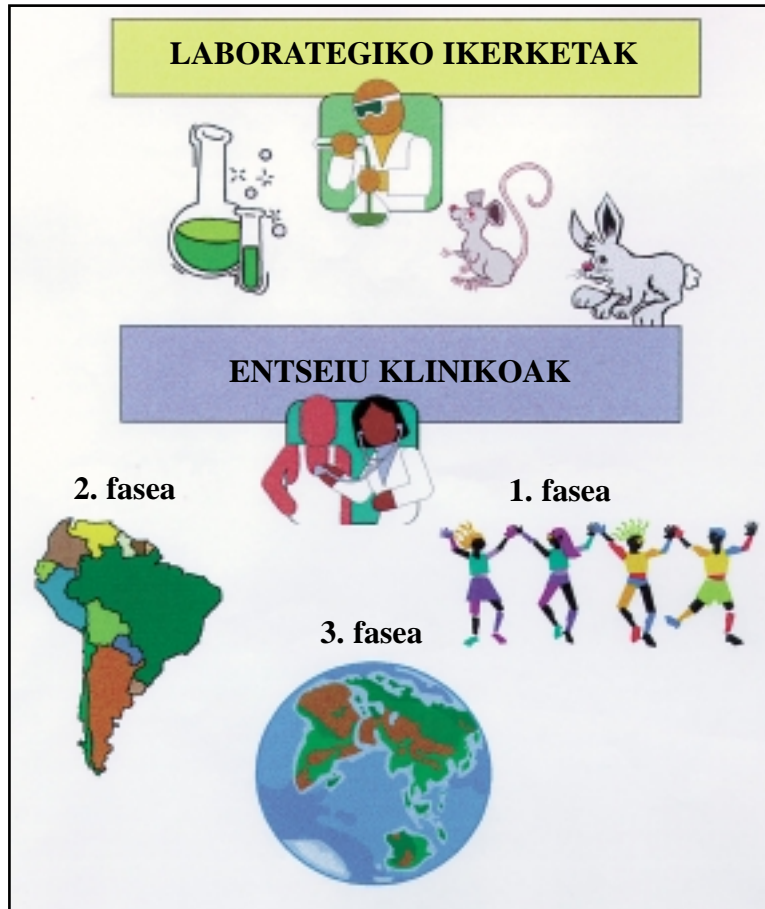
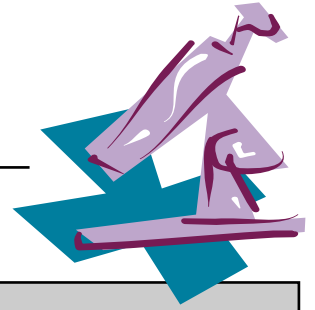
Orain arte egindako ADN txertoak muskuluetan txertatzeko izan arren, ahotik edo mukosetatik hartzeko ADN txertoak sortzeko posibilitatea ere badago. Aukera hori oso interesgarria izango litza-teke, adibidez, beherakoak prebenitzeko. Dagoeneko ikertzaile-talde batek *Shigella* zepa moteldu bat erabiltzea lortu du ADNa heste-paretean sartzeko¹¹.

Minbiziaren kontrako txertoak egin

Orain arte txerto antiinfekziosoei buruz jardun dugu, baina ari dira ADN txertoak animalietan frogatzen linfomak kontrolatzeko¹². Datozen urteotan ADN txertoek minbiziaren arloan ere izango dituzte aplikazio interesgarriak.

Segurtasuna frogatzeko metodologia zehatza eta zorrotza erabili

Aipatu ditugun arriskuak ebaluatzeko gaur egun badugu aukera. Animalien zeluletan txertatutako ADNa kromosometan integraturik dagoen ala ez ikertzeko, ADN kromosomikoa eta plasmidikoa banatzeko metodologia zehatza badago. Behin plasmido moduan geratzen den txertoa alde batera utzita, ADN kromosomikoa aztertu beharko da PCR teknikaren bidez txertoaren ADNa bilatze-



4. irudia. Txerto berri bat egiteko faseak.

ko. Teknika hori oso sentikorra da, txertoaren plasmidoaren kopia bat 150.000 zelulen artean detektatzeko adina. Gripearean kasuan metodologia hori aplikatuz txertatutako plasmidoak degradatzen direla frogatu da. ($1,5 \cdot 10^{11}$ kopia txertatu eta 6 aste geroago $1,5 \cdot 10^3$ geratzen dira). Bestalde kasu honetan ez dute inondik inora kromosometan kopia integraturik aurkitu⁶.

Kasu bakoitzean kostua eta etekina konparatu

Dena den, kasuz kasuko ebaluaketa egin beharko da, eta kasu bakoitzean, ADN txertoak eragin ditzakeen arriskuak txertoa ez erabiltzeak ekar ditzakeen kaltekin konparatu. B hepatitisaren kasuan, adibidez, txertoagatik minbizia sortzeko probabilitatea konparatu behar dugu txertaketaren bidez lortu dugun hepatokarzinoma-kopuruaren gutxitzearekin¹³.

Txerto berriak eratzeko faseak
Edozein kasutan ere, txerto berri bat merkaturatu baino lehen urrats guztiek arrakastatsuak izan behar dute: a) laborategiko frogak, diseinatutako plasmidoak eratzeko eta txertoa animaliekin saiartzeko eta b) entseiu klinikoak: lehenengo fasean boluntario-talde txikiekin txertoa kaltegarri ez dela frogatzeko, 2. fasean talde handi batekin dosiak eta txertaketaren pautak aukeratzeko eta azkenean, 3. fasean, populazio handi batean txertaketak onuragarriak direla frogatzeko¹⁰ (4. irudia). Gaur egun ADN txerto batzuk diseinatu eta frogatu egin dira animaliekin, baina entseiu klinikoak egiteke daude¹⁵.

- 1 EHU-ko irakaslea eta OEEko kidea.
- 2 EHU-an doktorego ikaslea

BIBLIOGRAFIA

1. BARRY M A eta lag. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature* 1995; 377: 632-635.
2. DONNELLY J J, MARTINEZ D, JANSEN K U, ELLIS R W, MONTGOMERY D L eta LIU M A. Protection against Papillomavirus with polynucleotide vaccine. *The Journal of Infectious Diseases* 1996; 713: 314-320.
3. KRIEG A M, YI AK, MATSON S, WALDSCHMIDT T J, BISHOP G A, TEASDALE R, KORETZKY G A eta KLINMAN D M. CpG motifs in bacterial ADN trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374:546-549.
4. KRIESEL J D, SPRUANCE S L, DAYNES R A eta ARANEO B A. Nucleic acid vaccine encoding gD2 protects mice from Herpes Simplex virus type 2 disease. *The Journal of Infectious Diseases* 1996;173:536-541.
5. Mc DONNELL W M, eta ASKARI F K. ADN vaccines. *The New England journal of medicine* 1996; 334:42-45.
6. NICHOLS W W, LEDWITH B J, MANAM S V eta TROILO P J. Potential ADN vaccine integration into host cell genome. *Annals New York Academy of Sciences*1995; 772: 30-39.
7. ROBERTSON J S. Safety considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccina* 1994; 12:1526-1528.
8. SCHIRMBECK R, BOHM W, ANDO K, CHISARI F eta REIMANN J. Nucleic acid vaccination primes Hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. *Journal of Virology* 1995; 69: 5929-5934.
9. SIEGRIST CA eta LAMBERT PH. ADN vaccines: what can we expect. *Infectious Agents and Disease* 1996; 5:55-59
10. SMITH H A. Regulatory considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccine* 1994; 12:1515-1519.
11. SIZEMORE D R, BRANSTROM A A eta SADOFF J C. Attenuated Shigella as a ADN delivery vehicle for ADN-mediated immunization. *Science* 1995; 270: 299-302.
12. STEVENSON F K, ZHU d, KING C A, ASHWORTH L J, KUMAR S eta HAWKINS R E. Idiomatic ADN vaccines against B-cell lymphoma. *Immunological Reviews* 1995; 145:211-228
13. TEMIN H M. Overview of biological effects of addition of ADN molecules to cells. *Journal of Medical Virology* 1990;31:13-17.
14. ULMER J B, DONNELLY J J, PARKER S E, RHODES G H, FELGNER P L, DWARKI V J, GROMKOWSKI S H, DECK R R, DeWITT C M, FRIEDMAN A, HAWE L A, LEANDER K R, MARTINEZ D, PERRY H C, SHIVER J W, MONTGOMERY D L eta LIU M A. Heterologous protection against Influenza by injection of ADN encoding a viral protein. *Science* 1993; 259: 1745-1749.
15. ULMER J B, SADOFF J C eta LIU M A. ADN vaccines. *Current Opinion in Immunology* 1996; 8:531-536