
Nederlandse samenvatting

Wanneer in een gesprek het onderwerp ‘gentherapie’ wordt aangesneden, wordt vrijwel onmiddellijk stier Herman van stal gehaald. Dit gebeurt ten onrechte. Stier Herman is een kloon en kloneren is niet hetzelfde als gentherapie.

Wat is het verschil tussen kloneren en gentherapie? Kloneren is het overbrengen van het erfelijk materiaal van een donorcel naar een bevruchte eicel, waaruit het erfelijk materiaal verwijderd is. Dit houdt in dat het individu dat uit deze eicel voortkomt over precies dezelfde genetische informatie beschikt als de donor. In het geval van stier Herman werd het erfelijk materiaal van de donor genetisch gemodificeerd. Het gen voor de aanmaak van lactoferrine werd ingebouwd, zodat de melk van de door stier Herman verwekte koeien lactoferrine zou bevatten. Lactoferrine kan gebruikt worden om de afweer tegen bacteriën en virussen in bijvoorbeeld AIDS-patienten te verbeteren.

In het geval van een natuurlijke bevruchting versmelten een mannelijke zaadcel en een vrouwelijke eicel. Geslachtscellen zijn haploid. Dat betekent dat ze van alle genen één kopie bevatten. Bij versmelting van twee geslachtscellen ontstaat een diploide cel. Deze cel bevat van alle genen twee kopieën, één kopie van de vader en één kopie van de moeder. De genetische informatie van een dochtercel verschilt bij geslachtelijke voortplanting dus van die van de oudercel. Genen kunnen dominant of recessief zijn. Wanneer een individu van een bepaald gen een dominante kopie van de vader heeft meegekregen, bijvoorbeeld het gen dat codeert voor een bruine oogkleur, en een recessieve kopie van de moeder, het gen dat codeert voor een blauwe oogkleur, zal de dominante kopie in de betreffende eigenschap tot uiting komen. Het individu zal bruine ogen hebben.

Gentherapie omvat de behandeling van genetische afwijkingen in een individu middels het toevoegen van genetische informatie. Zo kan een defect gen vervangen worden door een correcte versie van dat gen, of kan de expressie van een gemuteerd en daardoor schadelijk gen worden afgeremd. Taaislijmziekte (cystic fibrose) wordt veroorzaakt door een defect in het cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-gen. Behandeling van cystic fibrose door middel van het inbrengen van een correct gen voor de CFTR, valt onder gentherapie. Maar ook de behandeling van kanker met genen die de kanker aanzetten tot zelfdoding (‘zelfmoordgenen’) rekent men tot gentherapie. In het ultieme geval zal met gentherapie een defect gen *vervangen* worden door een correcte versie van dat gen. In de praktijk richt men zich meer op het *toevoegen* van een correcte versie van het gen aan de genetische informatie van een individu. Expressie van het toegevoegde gen, in de vorm van een eiwit, corrigeert dan voor het afwijkende eiwit.

Het antwoord op de vraag wat het verschil is tussen kloneren en gentherapie is als volgt: kloneren leidt, wanneer de oudercel genetisch is gemanipuleerd, tot de expressie van het geïntroduceerde genetisch materiaal in alle lichaamscellen van een individu, inclusief de geslachtscellen. Dit impliceert dat de genetische modulatie wordt doorgegeven aan het nageslacht. Gentherapie is gericht op het herstel van een genetisch defect in een beperkte groep cellen, zoals bijvoorbeeld longepitheelcellen in het geval van cystic fibrose. Het geïntroduceerde gen (transgen) komt niet in de geslachtscellen terecht en wordt daardoor niet doorgegeven aan het nageslacht van het met-gentherapie-behandelde individu. Waar kloneren vooral toepassing zal vinden in het genetisch manipuleren van landbouwgewassen, zal gentherapie gebruikt worden als medicijn in de behandeling van genetische afwijkingen in de mens. In plaats van de symptomen van een genetisch defect te behandelen, kan met gentherapie de ziekte vanaf de oorsprong worden bestreden.

Om een therapeutisch effect van een geïntroduceerd gen te bewerkstelligen, oftewel voor een succesvolle gentherapie, zal expressie van het transgen in meerdere cellen nodig zijn. Zo is in het geval van kanker gemakkelijk voor te stellen dat niet één, maar alle kankercellen gedood moeten worden door expressie van het transgen. Maar hoe krijg je specifiek expressie van het transgen in de kankercellen en niet in andere lichaamscellen? Hiertoe zal het transgen verpakt moeten worden in een dragersysteem, dat zijn inhoud kan afleveren op de gewenste plek in het lichaam. Positief geladen vetten (lipiden) kunnen genen (DNA), die een negatieve lading hebben, aan zich binden. In celcultures (*in vitro*) is aangetoond dat deze lipiden-DNA-complexen ('lipoplexen') het DNA kunnen afleveren in cellen, wat uiteindelijk leidt tot expressie van het DNA. Voor gentherapie zullen deze lipoplexen, na inspuiten in het lichaam, hun weg moeten vinden naar de gewenste cellen en in deze cellen het transgen tot expressie moeten brengen. Momenteel is het nog niet mogelijk lipoplexen hun weg te laten vinden naar een specifieke celpopulatie ('targeten'). Echter, voor toepassingen van gentherapie buiten het lichaam (*ex vivo*) is targeten niet nodig en het is waarschijnlijker dat *ex vivo* gentherapie op een kortere termijn dan *in vivo* gentherapie succesvol zal zijn. *Ex vivo* toepassingen van gentherapie zijn, onder andere, het zuiveren van beenmergtransplantaten van kankercellen en het voorkómen van afstoting van orgaantransplantaten.

Om (*ex vivo*) gentherapie te optimaliseren is het belangrijk tot in detail te weten hoe lipoplexen een cel binnendringen en vervolgens hun DNA afleveren in de celkern, wat nodig is voor expressie van het DNA (transfectie). Aangezien lipoplexen qua structuur lijken op celmembranen werd lange tijd aangenomen dat lipoplexen zouden versmelten (fuseren) met de

cel en zo hun inhoud in de cel zouden afleveren. Recent is echter aangetoond dat lipoplexen door cellen worden opgenomen via endocytose, een proces waarbij gedeeltes van de celmembraan naar de binnenkant van de cel worden afgesnoerd (fig. 1). Dit heeft tot gevolg dat het lipoplex in de cel zit opgesloten in een blaasje (endosoom). Aangezien in dit blaasje uiteindelijk afbraak van het lipoplex zal optreden, zal het lipoplex uit dit blaasje moeten ontsnappen. Door reorganisatie van lipiden in het lipoplex en het endosoom ontstaan waarschijnlijk gaten in het endosoom waardoor het DNA kan ontsnappen. Uiteindelijk zal het DNA door de celkern moeten worden opgenomen om tot expressie te kunnen komen in de vorm van een eiwit. Het is tot op heden niet duidelijk of het DNA wanneer het vrijkomt in het cytoplasma van de cel gecomplexeerd is met lipiden of ‘naakt’ is en of lipiden een rol spelen in het transport van het DNA richting de celkern. Voor de opname van DNA in de celkern zijn twee mogelijkheden: òf het DNA wordt gekoppeld aan een eiwit dat door de kern wordt opgenomen, òf het DNA dringt de kern binnen tijdens celdeling (mitose). Tijdens mitose verdwijnt tijdelijk de kernmembraan waardoor het DNA vrij toegang heeft tot de kern van de cel.

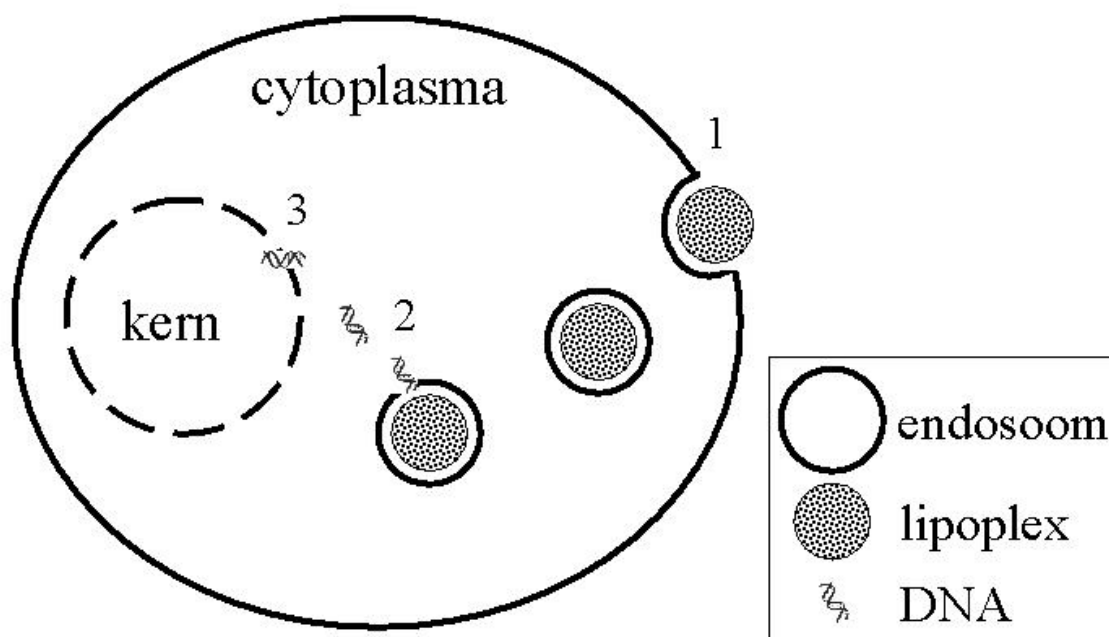


Figure 1: Het mechanisme van lipoplex-gemedieerde transfectie. Lipoplexen worden door de cel opgenomen via endocytose (1). Vervolgens ontsnapt DNA uit het endosoom door het ontstaan van gaten in het endosoom (2). Het DNA wordt tenslotte door de kern opgenomen via koppeling aan een eiwit of tijdens mitose (3), waarna het tot expressie kan komen in de vorm van een eiwit.

In dit proefschrift wordt beschreven dat lipoplexen via clathrine-gemedieerde endocytose worden opgenomen door cellen. Normaliter is clathrine-gemedieerde endocytose voorbehouden aan de internalisatie van receptor-ligand complexen, wat impliceert dat lipoplexen binden aan receptoren op het plasmamembraan van de cel. Welke receptoren een rol spelen in de opname van lipoplexen is onbekend. Mogelijkerwijs speelt (aspecifieke) binding van lipoplexen aan glycosaminoglycanen een rol in de cellulaire internalisatie van lipoplexen. Alhoewel de opname van lipoplexen door een cel een eerste vereiste is voor transfectie, lijkt het niet de beperkende factor te zijn. Belangrijker is dat, na opname via endocytose, het DNA uit het endosoom ontsnapt. Hiermee wordt voorkomen dat het DNA wordt afgebroken en komt eveneens de weg vrij naar de celkern. De grootte evenals de oppervlakte-eigenschappen van een lipoplex lijken bepalend te zijn voor de efficiëntie waarmee het DNA uit het endosoom kan ontsnappen. Wanneer interactie tussen het lipoplex en het endosomale membraan wordt verhinderd, komt er geen DNA vrij in het cytoplasma van de cel en zal er geen transfectie plaatsvinden. Voor een efficiënte transfectie lijkt het cruciaal te zijn dat het lipoplex een zogenaamde hexagonale fase aaneemt. Deze hexagonale fase kan bevorderd worden door de aanwezigheid van negatief geladen lipiden afkomstig uit het endosoom. Het is bekend dat hexagonale fases van lipiden membranen kunnen destabiliseren, waardoor hierin gaten kunnen ontstaan. Extra bewijs voor de importantie van de hexagonale fase in transfectie ligt in het feit dat toevoeging van dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), een lipide dat op zichzelf deze fase kan vormen, in het lipoplex transfectie kan stimuleren. Een andere functie van DOPE is, het verzwakken van de binding tussen het positief geladen lipide en het DNA, waardoor het DNA gemakkelijker wordt losgelaten wanneer het lipoplex een interactie aangaat met het endosomale membraan. Tenslotte wordt beschreven dat de aanwezigheid van DNA in een dicht-opeen-gerolde vorm ('supercoiled') belangrijk is voor een effectieve translocatie over het endosomale membraan.