

## **MODYFIKACJE GENETYCZNE W KOMÓRKACH MACIERZYSTYCH NA POTRZEBY TERAPII GENOWEJ *EX VIVO*\***

GENETIC MODIFICATION OF STEM CELLS FOR *EX VIVO* GENE  
THERAPY

Natalia ROZWADOWSKA, Maciej KURPISZ

Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

*Streszczenie:* Postęp badań związanych z komórkami macierzystymi włączając ich modyfikacje genetyczne pozwolił na uzyskanie niezmiernie obiecujących wyników. Jedną z głównych barier, które napotkała terapia genowa *ex vivo*, jest dostarczenie przygotowanej konstrukcji genetycznej do komórek docelowych. Zarówno wektory plazmidowe wprowadzane metodami fizykochemicznymi, jak i wektory wirusowe mają swoje miejsce w przygotowaniach czynionych w celu implantowania do narządu biorczego modyfikowanych genetycznie komórek allo- lub autologicznych. Modyfikacje genetyczne obejmują geny terapeutyczne, reporterowe czy sekwencje regulatorowe mogące wspomagać implantację komórek macierzystych, ograniczać stan zapalny czy apoptozę lub wspomagać fizjologiczną funkcję uszkodzonych narządów czy struktur. Opracowanie przedstawia postępy w opracowaniu genetycznych konstrukcji oraz wskazuje na główne trendy wykorzystywania modyfikowanych komórek macierzystych w próbach terapii chorób tak wrodzonych, jak i nabytych.

*Słowa kluczowe:* komórki macierzyste, modyfikacje genetyczne, wektory, regeneracja narządowa.

*Summary:* Progress of research on stem cells including their genetic modifications allowed to obtain very promising results. However, one of the main barriers that (*ex vivo*) therapy has been encountered was delivery of genetic construct to the target cell. As well plasmids (delivered with using physico-chemical methods) as viral vectors have its prominent place at preparations aimed to implant genetically modified stem cells (auto- or allogenic origin) to recipient organ. Genetic modifications involve therapeutic, reporter or regulatory genes which may help to implantation of stem cells itself, to limit inflammatory process or apoptosis, to enhance physiological function of damaged organs/tissues. This review presents a progress in invention of novel genetic constructs and indicates main trends for application of genetically modified stem cells as therapeutic agents for either congenital or acquired pathologies.

*Key words:* stem cells, genetic modification, vectors, organ regeneration.

\*Pracę dofinansowano z projektów MNiSzW nr N 403 065 31/3011 oraz rozwojowego nr N R13 0065 06.

## WSTĘP

Komórki macierzyste stanowią potencjalne źródło dla przeprowadzania regeneracji narządowej czy dostarczania białek terapeutycznych. Ze względu na pochodzenie rozróżnia się dwa podstawowe typy komórek macierzystych: wyodrębnione z węzła zarodkowego zarodkowe komórki macierzyste – ESC (ang. *Embryonal Stem Cell*) oraz izolowane ze zróżnicowanych tkanek organizmu somatyczne komórki macierzyste – ASC (ang. *Adult Stem Cell*). Multipotentne somatyczne komórki macierzyste uzyskano z wielu tkanek i narządów, zwłaszcza ze szpiku, jak np. mezenchymalne komórki macierzyste – MSC (ang. *Mesenchymal Stem Cell*), jak i kości, mięśni (mioblasty), tkanki tłuszczowej, nerwowej i innych [2, 11,27].

Genetyczne modyfikacje komórek macierzystych (poprzedzające ich transplantację) to jedne z najczęściej opisywanych w literaturze przedmiotu zagadnień badawczych. Terapia z wykorzystaniem takich komórek nosi nazwę terapii genowej *ex vivo* i polega na wprowadzeniu za pomocą dostępnych metod molekularnych „obcego” DNA (w formie wektora pochodzenia wirusowego bądź plazmidu) do komórek allo- bądź autologicznych, a następnie podanie ich do narządu patologicznie zmienionego (biorcy).

Biorąc pod uwagę złożoność tej problematyki w przedstawionym doniesieniu zostaną opisane główne metody wprowadzania wektorów zawierających „obcy” DNA, a także zadania stawiane komórkom czy nadzieje z związane z komórkami zarówno ES, jak i pozyskanymi od osobników dorosłych ze szczególnym uwzględnieniem komórek mezenchymalnych.

## I. METODY WPROWADZANIA DNA DO KOMÓREK MACIERZYSTYCH (*EX VIVO*)

Wprowadzanie DNA do komórek polega na dwóch głównych metodach, tj. zastosowaniu wektorów wirusopodobnych korzystających przy wnikaniu do komórki z naturalnie występujących receptorów oraz wektorów plazmidowych wprowadzanych do komórki metodami fizyko-chemicznymi, takimi jak: elektroporacja czy lipofekcja.

Przygotowanie odpowiedniego wektora przenoszącego interesujący nas transgen możliwe jest dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej. Wybrany gen (zazwyczaj jest to sekwencja kodująca pozbawiona intronów) lub sekwencję regulatorową należy najpierw wyizolować i zamplifikować za pomocą techniki PCR, a następnie wklonować do przygotowanego wektora, czyli cząsteczki DNA pełniącej rolę nośnika.

W chwili obecnej dostępnych jest wiele wektorów opartych na budowie plazmidu. Wspólne sekwencje zawarte w wektorach, które należy wymienić, to miejsce startu replikacji *ori*, odcinek zwany MCS (ang. *Multicloning Site*) zawierający sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne i umożliwiające wklonowanie pożądanego insertu DNA oraz gen lub geny oporności na antybiotyk (ampicylinę, tetracyklinę, neomycynę czy

G418) umożliwiającą selekcję klonów bakteryjnych zawierających konstrukcję lub w późniejszym etapie selekcję komórek eukariotycznych zmodyfikowanych genetycznie.

Przygotowana konstrukcja DNA w zależności od prowadzonych doświadczeń może zawierać tzw. geny reporterowe, takie jak: GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*), lucyferaza czy beta-galaktozydaza, sekwencje dla określonych produktów genowych (insulina czy czynnik IX krzepnięcia krwi) czy sekwencje kodujące regulatorowe RNA – miRNA (ang. *microRNA*), RNAi (ang. *RNA Interference*), shRNA (ang. *Short Hairpin RNA*). Kluczowym jest także umieszczanie odpowiednio dobranych promotorów gwarantujących ekspresję stabilną, np. wirusowy promotor CMV (cytomegalowirus) bądź eukariotyczny EF1 (ang. *Elongation Factor 1*) czy też ekspresję tkankowo specyficzną w komórkach skierowanych na odpowiedni tor różnicowania [60]. Dostępne są również „promotory warunkowe”, które umożliwiają włączanie i/lub wyłączenie ekspresji przy zastosowaniu leków (np. tetracyklina – promotor typu *tet-on/off*) bądź też odpowiadające ekspresją na określone warunki środowiska, takie jak hipoksja zawierająca sekwencję HRE (ang. *Hypoxia Response Element*) [33].

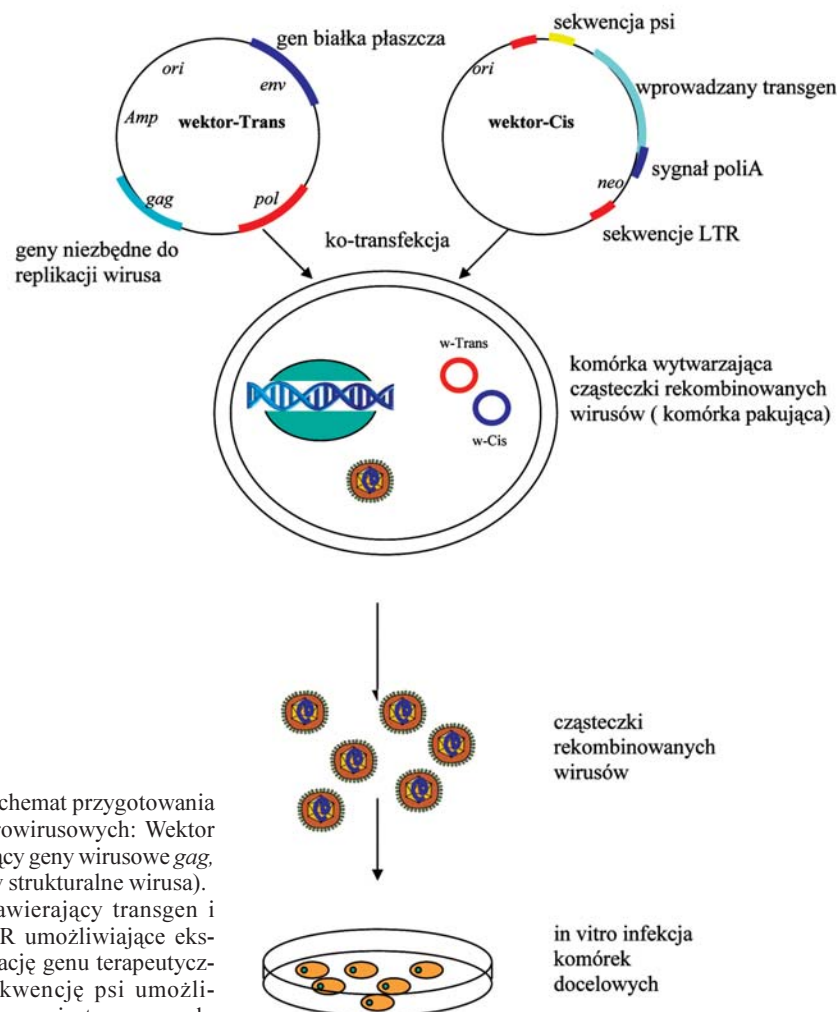
Elementem spotykanym w wektorach jest sygnał poliadenylacji powstającego transkryptu, jak również sekwencja IRES (ang. *Internal Ribosome Entry Site*), która umożliwia powstanie transkryptu bicistronowego (jeden transkrypt kodujący dwa niezależne białka, np. gen reporterowy – GFP i gen terapeutyczny). Zawarcie w sekwencji plazmidu odcinka kodującego nukleazę połączoną ze strukturą palca cynkowego ZFN (ang. *Zink Finger Nuclease*) umożliwia integrację transgenu w ściśle określonym miejscu genomu. Sprzężenie nukleazy z palcem cynkowym skutkuje powstaniem dwuniciowego pęknięcia DNA w miejscu rozpoznawanym przez ZFN (unikatowym dla danego ZFN) i poprzez rekombinację homologiczną pomiędzy chromosomem a ekstrachromosomalnym DNA (donorowym) następuje włączenie sekwencji plazmidowej do genomu gospodarza [66].

Wektory wirusowe oprócz sekwencji wspomnianych wyżej muszą zawierać sekwencje pochodzenia wirusowego stanowiące elementy umożliwiające prawidłowe przygotowanie wektora w przystosowanej linii komórkowej (patrz wektory wirusowe). Wektory stosowane w inżynierii genetycznej podlegają ciąglemu udoskonalaniu tak, że w tej chwili można bez większych problemów dobrać składowe wektora w zależności od wymagań stawianych zarówno przez zadania badawcze, jak i próby kliniczne.

## 1. Wektory pochodzenia wirusowego

Wektory te są stosowane w zarówno terapii genowej *in vivo*, jak i *ex vivo*, a największą ich zaletą jest wysoka efektywność wprowadzania „obcego” DNA. Konstrukcja wektora polega na zastąpieniu części genomu wirusa odpowiednio przygotowaną kasetą DNA zawierającą sekwencje terapeutyczne. Jednocześnie zostaje usunięta większość sekwencji wirusowych niezbędnych do namnażania czy tworzenia białek otoczki wirusów. Tak skonstruowany wektor wirusopochodny jest w pełni zdolny do wniknięcia do wnętrza komórki przy jednoczesnym braku możliwości tworzenia nowych cząsteczek wirusowych mogących wywołać niekontrol-

lowane efekty uboczne. Białka niezbędne do replikacji oraz tzw. białka płaszcza dostarczane są przez wirus pomocniczy działający w układzie *trans*, w trakcie produkcji wirionów w linii komórkowej (hodowla *in vitro*), w procesie przygotowywania rekombinowanych cząsteczek wirusa. Uproszczony schemat rozmieszczenia genowych sekwencji wirusowych oraz zawierających geny terapeutyczne w odpowiednich wektorach w trakcie przygotowania cząsteczek rekombinowanych wirusów przedstawia rycina 1. Wśród stosowanych wektorów najczęściej wymienia



RYCINA 1. Schemat przygotowania wektorów retowirusowych: Wektor trans zawierający geny wirusowe *gag*, *pol*, *env* (geny strukturalne wirusa). Wektor cis zawierający transgen i sekwencje LTR umożliwiające ekspresję i integrację genu terapeutycznego oraz sekwencję psi umożliwiającą zapakowanie transgeny do kapsydu. Wprowadzenie obu wektorów do komórki „pakującej” prowadzi do jednoczesnej transkrypcji transgeny i genów wirusowych. Pakowanie transgeny w wirusowe otoczki białkowe powoduje powstanie cząsteczek rekombinowanych wirusów pozbawionych wirusowych genów

FIGURE 1. Preparation of recombinant viruses

się retro-, lenti-, adenowirusy (AdV) oraz wirusy towarzyszące adenowirusom – AAV (ang. *Adeno-associated Virus*).

**Retrowirusy.** Wektory retrowirusowe zostały skonstruowane na podstawie sekwencji wirusa MoMuLV (ang. *Moloney Murine Leukemia Virus*). Charakteryzują się wysoką infekcyjnością tylko w odniesieniu do komórek dzielących się i zapewniają długoterminową ekspresję kodowanych przez siebie białek poprzez integrację własnego DNA z DNA gospodarza. Duży potencjał proliferacyjny komórek macierzystych stanowi o tym, że są potencjalnie doskonałym celem modyfikacji genetycznych z użyciem wektorów retrowirusowych. Jednak fakt losowej integracji wirusowego DNA stwarza zagrożenie tzw. mutagenyzy insercyjnej, czyli wbudowaniu się wektora w nieodpowiednim miejscu w genomie i przez to zaburzenie funkcji ważnych genów bądź aktywację protoonkogenów. Podczas zastosowania wektorów tego typu w terapii genowej u pacjentów istnieje ryzyko choroby nowotworowej. Najszerzej opisywanym przypadkiem jest rozwinięcie się białaczki u pacjentów leczonych z powodu niedoboru odporności (ang. *X-linked Immunodeficiency-SCID-XI*) modyfikowanymi genetycznie komórkami macierzystymi szpiku [7].

Badane w chwili obecnej wektory wirusopodobne pozbawione są regionów promotorowo/enhancerowych i wydaje się, że ich zastosowanie wiąże się ze znacznie mniejszym ryzykiem wystąpienia transformacji nowotworowej. Ponadto zaobserwowano, iż zmodyfikowane wektory z mniejszą częstością wbudowywane są do regionów protoonkogennych [7].

**Lentiwirusy.** Lentiwirusy stanowią podklasę retrowirusów, do której należą wirusy zespołu nabytego braku odporności – HIV (ang. *Human Immunodeficiency Virus*), FIV (ang. *Feline Immunodeficiency Virus*), EIAV (ang. *Equine Infectious Anemia Virus*), ale w odróżnieniu od klasycznych wektorów pochodzenia retrowirusowego charakteryzują się zdolnością infekowania komórek tak aktywnych, jak i nieaktywnych mitotycznie. Podobnie jak retrowirusowe, DNA pochodnych lentiwirusów podlega integracji z genomem gospodarza i zapewnia stałą ekspresję wprowadzanych sekwencji. Do wektorów tego typu można wklonować odcinek DNA o długości ok. 9 kpz (to jest 9 tys. par zasad). Dane literaturowe potwierdzają możliwość wykorzystania wektorów pochodzenia lentiwirusowego do transdukcji wielu typów komórek w tym: mysich komórek ES [3] oraz hematopoetycznych komórek macierzystych [29], mioblastów [5], macierzystych komórek nerwowych – NSC (ang. *Neural Stem Cell*) i innych. Wprowadzanie sekwencji genowych do komórek NS (charakteryzujących się niskim potencjałem proliferacyjnym) z powodzeniem wykorzystuje wektory pochodzenia lentiwirusowego przy bardzo ograniczonej możliwości stosowania wektorów retrowirusopochodnych. Jednak obecnie stosowane wektory konstruowane są przede wszystkim przy użyciu sekwencji pochodnych wirusa HIV, co może budzić wątpliwości dotyczące bezpieczeństwa zwłaszcza wśród potencjalnych pacjentów (biorców).

**Adenowirusy.** Pochodne adenowirusów (AdV) to jedne z najczęściej stosowanych wektorów na potrzeby terapii genowej *in vivo* zwłaszcza w aspekcie prób klinicznych. Wysoka pojemność genetyczna takich wektorów (zwłaszcza najnowszej generacji) pozwala na umieszczenie sekwencji nawet do 30 kpz, co umożliwia

tworzenie konstrukcji poligenowych łącznie z ich sekwencjami regulatorowymi. Dwuniciowy DNA adenowirusowy nie podlega integracji z genomem i pozostaje w formie episomalnej w komórce gospodarza zapewniając przejściową ekspresję białka na stosunkowo wysokim poziomie, a równocześnie nie niesie ryzyka mutagenyzy insercyjnej. Wraz z podziałami komórki liczba kopii wektora ulega jednak obniżeniu, co powoduje spadek poziomu transgenicznego produktu białkowego [33]. Odnotowane skutki uboczne stosowania wektorów AdV odnoszą się przede wszystkim do prób terapii genowej *in vivo*, w trakcie których podanie rekombinowanych wirusów może wywołać zainicjowanie odpowiedzi immunologicznej (poprzez naturalnie występujące przeciwciała anti-Ad5) u ludzi. Nowa generacja wektorów adenowirusopochodnych – HDAdV (ang. *Helper Dependent AdV*) nie tylko nie powoduje aktywnej odpowiedzi ze strony układu odpornościowego, ale również umożliwia zastosowanie mechanizmu rekombinacji homologicznej z wykorzystaniem sekwencji HPRT1 (ang. *Hypoxantine Guanine Phospho-ribosyltransferase 1*) i przez to integrację wprowadzanego DNA w ściśle określonym miejscu genomu [49].

**Wirusy towarzyszące adenowirusom** – AAV (ang. *Adeno-associated virus*) są wirusami z grupy parwowirusów zawierającymi jednociowy DNA. Genom wirusa AAV nie koduje białek niezbędnych przy replikacji, natomiast wykorzystuje białka kodowane przez inne wirusy (adeno- lub herpeswirusy), które znajdują się w zainfekowanej komórce. Wirusy AAV mają zdolność integracji z genomem gospodarza w ściśle określonym miejscu na chromosomie 19 (19q13.4) i według dotychczasowych danych nie wywołują żadnych objawów chorobowych. Wektory AAV infekują zarówno komórki dzielące się, jak i w stanie spoczynku, jednak ich pojemność jest ograniczona do sekwencji o długości ok. 5 kbp. Wykazano, iż rekombinowane wirusy AAV mają zdolność infekcji: mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku [49], jaj oraz mysich i ludzkich macierzystych komórek zarodkowych [4].

## 2. Niewirusowe (fizyko-chemiczne) metody wprowadzania wektorów DNA

Pomimo wysokiej wydajności transdukcji komórek przez wektory pochodzenia wirusowego, ryzyko związane z ich stosowaniem obejmuje nie tylko mutagenę insercyjną, ale również potencjalną możliwość rekombinacji z genomem gospodarza oraz ekspresję genów wirusowych *per se*. Nie bez znaczenia jest również skomplikowany proces produkcji rekombinowanych wirusów wymagający odpowiednio zabezpieczonych i wyposażonych laboratoriów oraz wyszkolonego personelu. Niewirusowe metody wprowadzania „obcego” DNA opierają się przede wszystkim na elektroporacji oraz stosowaniu związków chemicznych (takich jak: lipidy kationowe, polimery i fosforan wapnia). Funkcjonuje także wiele metod opartych na fizycznym wprowadzaniu DNA do komórek (mikroiniekcja, biolistyka, megnetofekcja, sonoporacja), jednak ich stosowanie nie jest szeroko rozpowszechnione.

Porównując metody wprowadzania obcego DNA do linii ludzkich komórek zarodkowych Wu i wsp. wykazali, że nie uwzględniając wektorów wirusowych najlepszą wydajnością transfekcji charakteryzuje się tzw. nukleofekcja (ok. 16%) – metoda oparta na elektroporacji opracowana przez firmę Amax [4]. Zastosowanie



lipofekcji i tradycyjnej elektroporacji skutkowało stosunkowo niską i porównywalną wydajnością ok. 1–2% [4]. Wcześniejsze badania na linii mESC wykazywały 63% wydajność nukleofekcji w porównaniu z 4% przy elektroporacji [31]. Zoptymalizowany protokół elektroporacji komórek hMSC ze szpiku wprowadzony przez Cool i wsp. pozwolił osiągnąć wydajność transfekcji na poziomie 90% [19].

Porównując lipidy kationowe od trzech różnych producentów (Fugene HD, Lipofectamina, ExGene500) Liu i wsp. wykazali, iż zastosowanie każdego z odczynników umożliwia wyrowadzenie linii komórkowej stabilnie stransfekowanej [36], przy czym najlepszą skutecznością charakteryzował się Fugene HD. Uzyskane linie nie różniły się profilem ekspresji i zdolnością różnicowania od linii niezmodyfikowanej [36]. Również MSC poddane lipofekcji wykazują ekspresję wprowadzonego DNA, przy czym odsetek komórek tranfekowanych waha się od 5 do 19% w zależności od rodzaju użytego czynnika [13].

Do transfekcji komórek macierzystych (zarodkowych i somatycznych) wykorzystuje się również syntetyczne polimery kationowe, takie jak poly( $\beta$ -aminoestry). Przy wysokiej przeżywalności komórek mogą one zapewnić ekspresję w ok. 40% komórek poddanych tej procedurze [63].

Niewirusowe metody wprowadzania DNA są postrzegane jako bardziej bezpieczne, jednak odsetek komórek, który podlega modyfikacji jest znacznie mniejszy niż przy stosowaniu wektorów wirusowych, co znacznie ogranicza ich użyteczność. Jednak dzięki zastosowaniu coraz to nowszych środków efektywność tych procedur uległa znaczącej poprawie, a przez optymalizację warunków wprowadzania DNA metody te zaczynają zyskiwać na znaczeniu jako bezpieczniejsze, tańsze i niewymagające specjalnych zabezpieczeń.

## II. TRENDY I KIERUNKI MODYFIKACJI GENETYCZNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Somatyczne i zarodkowe komórki macierzyste stanowią potencjalne źródło dla regeneracji narządowej. Obydwa rodzaje komórek mają cechy pożądane w terapii komórkowej, niestety mogą także wywoływać niekorzystne efekty uboczne. Utworzenie optymalnego protokołu, który umożliwiłby uzyskanie idealnej linii komórkowej wykorzystywanej w inżynierii tkankowej stanowi wyzwanie dla wielu wiodących grup naukowo-badawczych. Wśród cech korzystnych wlicza się: duży potencjał proliferacyjny umożliwiający uzyskanie adekwatnej liczby komórek gwarantującej efekt terapeutyczny, przy jednoczesnej niewielkiej liczbie komórek niezróżnicowanych mających potencjał nowotworowy. Podkreśla się także dużą odporność na niekorzystne warunki środowiskowe patologicznego narządu, wysoką zdolność do zasiedlania oraz maksymalnie niską immunogenność. Za pomocą inżynierii genetycznej przez modyfikacje genetyczne wydaje się realne wypracowanie schematu dla uzyskania linii komórkowych charakteryzujących się pożądanymi cechami.

## 1. Różnicowanie komórek macierzystych przez modyfikacje genetyczne

Jedną z większych trudności, jakie napotkano przy próbach terapii z zastosowaniem komórek macierzystych, jest uzyskanie odpowiedniej liczby komórek na danym etapie różnicowania, które po podaniu pacjentom gwarantowałyby efekt terapeutyczny. Optymalizacja składu podłoży hodowlanych przeznaczonych dla różnicowania komórek macierzystych zaowocowała pojawieniem się wielu mediów. Jednak ze względu na koszt oraz skuteczność w różnicowaniu komórek ich stosowanie nadal nie spełnia wysokich wymagań stawianych inżynierii tkankowej. Napotkano problemy zwłaszcza przy wydajności ukierunkowanego różnicowania komórek ES. Wprowadzenie modyfikacji genetycznych może potencjalnie doprowadzić do uzyskiwania homogennej populacji komórek przygotowanych dla przeszczepu tkankowego.

Wymuszona nadekspresja krytycznych dla początkowych etapów różnicowania komórkowego czynników transkrypcyjnych umożliwiłaby uzyskanie ze znacznie większą wydajnością komórek o pożądanym fenotypie. Wprowadzenie do linii hES stabilnej nadekspresji genów PDX1 (ang. *Pancreatic and Duodenal Homeobox 1*) oraz FOXA2 (ang. *Forkhead Box A2*), zaangażowanych w różnicowanie komórek endodermy, znacznie przyspieszyło pojawienie się struktur charakterystycznych dla różnicowania się komórek trzustki *in vitro* [32]. Rodriguez i wsp. różnicowali komórki ES przez wymuszone wyciszenie lub wzmacnianie ekspresji genu *OCT4* (ang. *Octamer-binding Transcription Factor 4*). Wysoki poziom *OCT4* promował powstanie komórek endo- lub mezodermy natomiast obniżenie poziomu produktu genowego spowodowało pojawianie się wczesnych komórek trofoblastu [41]. Wprowadzenie do linii mysich ESC genu *PAX6-5a* (ang. *Paired Box Gene 6*) indukowało powstanie komórek wykazujących cechy neuronalne [45]. Różnicowanie w kierunku rozmaitych typów komórek nerwowych obserwowano także podczas nadekspresji genów *NGN3* (ang. *Neurogenin-3*) [58], *RX/RAX* (ang. *Retina and Anterior Neural Fold Homeobox Gene*) [53], *NURR1* (ang. *Nuclear Receptor Related 1*) [26]. Dane literaturowe szeroko opisują modyfikacje genetyczne polepszające efektywność różnicowania ESC. Wprowadzenie genu *IGF-2* kodującego insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. *Insulin-like Growth Factor 2*) promuje różnicowanie komórek mięśniowych, genu kodującego czynnik iNOS (ang. *Nitric Oxide Synthase; Inducible*) powstanie kardiomiocytów i genu *SDF-1* (ang. *Stromal Cell Derived Factor-1*) prymitywnych komórek hematopoetycznych [16, 22, 23].

Somatyczne komórki macierzyste, a zwłaszcza komórki mezenchymalne, poddawane są modyfikacjom genetycznym w celu doprowadzenia do ich ukierunkowanego różnicowania. Wprowadzony do króliczych MSC gen *HCN2* (ang. *Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Potassium Channel 2*) kodujący białko kanału potasowego umożliwił wykorzystanie tych komórek w układzie serca przewodzącym bodźce (ang. *Pacemaker*) [67]. Wprowadzając do komórek mezenchymalnych adenowirusy zawierające elementy kodujące białka BMP-2 (ang. *Bone Morphogenetic Protein 2*) oraz TGF- $\beta$ 1 (ang. *Transforming Growth Factor beta 1*) uzyskano zróżnicowanie w komórki tkanki łącznej (chondrocyty) [37]. Wprowadzając do ludzkich MSC gen dla czynnika BMP-2 grupa Hu i wsp. zaobserwowała zarówno *in vivo* i *in vitro* różnicowanie w komórki kości [5].



Pomimo optymalizacji różnicowania komórek część z nich, z niejasnych dotąd przyczyn nie udaje się skierować na zdefiniowany tor. Transplantacja nawet niewielkiej liczby komórek niezróżnicowanych może powodować powstanie potworniaków, dlatego też niezbędna jest eliminacja elementów morfotycznych o charakterze zarodkowym. Wykorzystanie promotorów aktywnych na danym etapie różnicowania komórek oraz ekspresja tzw. białek reporterowych (takich jak lucyferaza czy GFP) umożliwia wyodrębnienie i późniejszą selekcję odpowiedniej populacji komórek. Wektor bicistronowy zawierający mRNA z promotorem dla  $\alpha$ -fetoproteiny kodujący eGFP oraz kasetę oporności na neomycynę został wykorzystany przez Kolossova i wsp. do uzyskania z mysiej linii ESC wykazującej cechy pierwotnych hepatocytów [8]. W prowadzonym na podobnej zasadzie doświadczeniu uzyskanie populacji kardiomiocytów (pozbawionych komórek niezróżnicowanych) oparto na wykorzystaniu promotora genu dla białka  $\alpha$ -MHC, ciężkiego łańcucha miozyny (ang. *Myosin Heavy Chain*). Strategia ekspresji reporterowych markerów fluorescencyjnych, jak i genów oporności na antybiotyki (neomycynę, puromycynę) z tkankowo specyficznymi promotorami została zastosowana przy selekcji i/lub identyfikacji komórek śródbłonna (z promotorem genu dla czynnika PECAM-1 – ang. *Platelet-endothelial Cell Adhesion Molecule*), komórek trzustki (promotor dla genu insuliny) czy neuronów dopaminowych (promotor genu *PTX3* – ang. *Pentraxin3*) wyprowadzanych z linii ESC [18, 25, 44].

Pomimo wielu zalet wspomnianych powyżej systemów, ich zastosowanie w badaniach klinicznych nasuwa wiele wątpliwości dotyczących zarówno wydajności, selekcji na podstawie fluorescencji (przy zastosowaniu cytometru), jak i toksyczności stosowanych antybiotyków [50]. Potencjalnie obiecującym białkiem markerowym jest białko błonowe LNGFR (ang. *Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor*). Jego ekspresja pod kontrolą odpowiedniego promotora umożliwia selekcję komórek z zastosowaniem pola magnetycznego (systemy MACS – ang. *Magnetic-activated Cell Sorting* lub *Dynabeads*). Ten rodzaj frakcjonowania komórek zapewnia bez skomplikowanych procedur i sprzętu preparatywne i przyżyciowe uzyskanie określonej populacji komórek [14]. Interesującym rozwiązaniem wydaje się również być włączenie do konstrukcji genowej tzw. genu „samobójczego”. Umożliwiłby on w razie wystąpienia nieprawidłowości (np. powstania guza) usunięcie wszystkich wprowadzonych do organizmu zmodyfikowanych genetycznie komórek. Przykładem takiego rozwiązania jest dołączenie do danego genu terapeutycznego genu kodującego kinazę tymidynową wirusa opryszczki – HSV-tk (ang. *Herpes Simplex Thymidine Kinase*), którego ekspresja nie wywiera żadnych znanych efektów ubocznych. W momencie, gdy usunięcie z organizmu biorcy podanych wcześniej komórek jest niezbędne, podany zostaje do krążenia „pro-lek” (gancyklowir). Ulegająca stałej ekspresji tylko w komórkach zmodyfikowanych kinaza tymidynowa pochodzenia wirusowego przekształca lek w jego cytotoksyczną postać. Następstwem tej reakcji enzymatycznej jest śmierć wszystkich komórek, które poddane były modyfikacji genetycznej [56].

## 2. Przetrawianie komórek macierzystych w warunkach *in vivo*

Zarówno terapia komórkowa, jak i terapia genowa z wykorzystaniem modyfikowanych komórek macierzystych napotkała problem zwiększenia apoptozy lub/i

nekozy w miejscu implantacji podawanych komórek. Przetrwanie komórek w miejscu podania jest ograniczone przez wiele czynników, takich jak: lokalny stan zapalny, reakcja układu odpornościowego czy hipoksja. Wprowadzając odpowiednie konstrukcje genowe można potencjalnie przygotować komórki na trudne warunki środowiska, zwiększyć odsetek komórek prawidłowo zaimplantowanych oraz zapewnić tolerancję ze strony układu immunologicznego biorcy (w przypadku wykonania przeszczepu z użyciem macierzystych komórek allogenicnych).

W tradycyjnej transplantologii od wielu lat trwają badania nad możliwością wykorzystania terapii genowej jako alternatywy dla farmakologicznej immunosupresji, która nie jest pozbawiona poważnych efektów ubocznych. Potencjalne wykorzystanie tych samych wektorów w połączeniu z zastosowaniem komórek macierzystych wydaje się logicznie uzasadnione. W doświadczalnej terapii genowej przeprowadzanej na modelach zwierzęcych testowano co najmniej kilka czynników mogących zapobiec odrzuceniu przeszczepu. Wśród badanych znalazły się: białka przeciwwzapalne (antagonista receptorowy IL-1, wydzielane formy receptora IL-1, IL-17 czy IL-18BP – białka wiążącego IL-18 (ang. *IL - Interleukin*), cytokiny regulatorowe, takie jak: IL-4, IL-10 czy TGF $\beta$ , czynniki cytoprotekcyjne – eNOS (ang. *Nitric Oxide Synthase; Endothelial*), SOD (ang. *Superoxide Dismutase*), HO-1 (ang. *Hemeoxygenase 1*). Następną grupą badanych transgenów były geny kodujące białka blokujące kostymulatory aktywatorów limfocytów T (np. CD40), które pełnią szczególnie ważną rolę przy wystąpieniu reakcji odrzucania przeszczepu. Wprowadzenie do komórek szpikowych biorcy alleli genów kodujących cząsteczki MHC (ang. *Major Histocompatibility Complex*) klasy I i II dawcy organu lub komórek wywoływało tolerancję allogenicznej tkanki przeszczepu [57].

W terapii komórkowej stosowano też wybrane rozwiązania zaczerpnięte z klasycznej transplantologii, wśród takich należy wymienić transdukcję komórek lentiwirusem zawierającym shRNA, wyciszającym ekspresję antygenów HLA (ang. *Human Leukocyte Antigens*). Tak zmodyfikowane komórki były odporne na alloreaktywne limfocyty T, zachowując jednak śladową ekspresję antygenów unikały odczynu cytotoksycznego zależnego od antygenów zgodności tkankowej [17]. Grupa Poznansky'ego i wsp. wykazała, że wysoka nadekspresja czynnika SDF-1 w implantowanych komórkach umożliwiała ich długoterminowe przetrwanie w miejscu podania [38]. Poprawę w implantacji, w mięśniu sercowym komórkom mezenchymalnym zapewniała także wymuszona ekspresja antyapoptotycznego genu *Akt-1* (ang. *Nuclear Factor Kappa-B Activator 1*), natomiast nadekspresja czynnika HO-1 poprawiała efektywność terapii w wyniku stymulacji ekspresji czynników proangiogennych i proliferacyjnych – VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*), FGF2 (ang. *Fibroblast Growth Factor 2*) przy jednoczesnym obniżeniu ekspresji mRNA dla białek prozapalnych, takich jak: TNF $\alpha$  (ang. *Tumor Necrosis Factor*), IL-1 $\beta$ , IL-6 [9, 65].

### 3. Dostarczanie czynników terapeutycznych i regeneracja narządów *in situ*

Większość badań poświęconych efektom terapii genowej *ex vivo* z wykorzystaniem komórek macierzystych skupia się na zagadnieniach wymienionych w tytule

tego podrozdziału. Nie sposób wymienić wszystkich badań prowadzonych na tym polu, w związku z czym zagadnienie zostanie zilustrowane wybranymi przykładami obrazującymi mnogość potencjalnych zastosowań genetycznie modyfikowanych komórek macierzystych w terapii chorób dziedzicznych i nabytych.

Jednym z wyzwań terapii molekularnej jest korekcja efektu spowodowanego przez uszkodzenie jednego genu. W tym przypadku należy rozróżnić podejście terapeutyczne wobec chorób związanych z nieprawidłowościami (lub niedoborami) czynników wydzielanych do krwi (czynnik IX i VIII krzepnięcia krwi, czynnik Willebranda czy  $\alpha$ 1-antytrypsyna), gdzie komórki produkujące prawidłową formę białka mogą zostać zaimplantowane w innym miejscu niż występujące naturalnie. Uszkodzenie białka wewnątrzkomórkowego ściśle powiązanego z funkcją pełnioną przez komórkę powoduje konieczność dostarczenia takiej komórki do miejsca związanego z prawidłową ekspresją danego genu (np. dystrofina do mięśni szkieletowych dotkniętych dystrofią) [50]. Należy wspomnieć również o możliwej reakcji ze strony układu immunologicznego na nieznaną dotąd dla organizmu antygen, jakim może być terapeutyczne białko produkowane przez zmodyfikowane genetycznie komórki [1].

W przypadku dziedzicznych chorób jednogenowych standardem jest transplantacja komórek, w których gen terapeutyczny ulega ekspresji stałej, a w przypadku innych chorób, w zależności od korygowanego stanu chorobowego, korzystna może być ekspresja przejściowa lub konstytutywna. Ekspresja przejściowa może być wskazana dla wytworzenia naczyń krwionośnych, przyspieszenia gojenia ran czy mineralizacji kości. Krótkotrwała ekspresja czynnika IGF-1 (ang. *Insulin-like Growth Factor 1*) podobnie jak EGF (ang. *Epidermal Growth Factor*) znacznie poprawiała leczenie trudno gojących się ran [20, 59]. Transplantacja MSC transfekowanych genem dla cytokiny TGF- $\beta$ 1 do uszkodzonego ścięgna Achillesa znacznie przyspieszyła leczenie i odzyskanie sprawności przez króliki poddane takiemu zabiegowi [21]. Podobnie jak wprowadzenie komórek z wymuszoną ekspresją genu dla czynnika BMP-2 usprawniło regenerację kości w porównaniu z komórkami niemodyfikowanymi [62]. Naprawa uszkodzeń tkankowych spowodowanych niedokrwieniem wymagać może przejściowej ekspresji czynników proangiogennych, takich jak VEGF – prace nad zastosowaniem tego białka prowadzone są przy terapii komórkowej: zawału serca [40], udaru mózgu [55] czy niedokrwieniu kończyn dolnych [64]. W tym przypadku długotrwała ekspresja VEGF byłaby niekorzystna i mogłaby potencjalnie doprowadzić do powstania naczyńniaka. Tworząc wektory wykorzystywane w tego rodzaju terapii bardzo często umieszcza się w nich wspomniane wyżej promotory warunkowe (tkankowo lub środowiskowo specyficzne oraz typu *tet-on/off*).

Terapia genowa połączona z terapią komórkową wydaje się mieć ogromny potencjał przy leczeniu chorób związanych z utratą lub uszkodzeniem funkcji komórek, takich jak: choroby neurodegeneracyjne czy uszkodzenie rdzenia kręgowego, uszkodzenie w wyniku zawału lub przeciążenie mięśnia sercowego czy trzustki.

Na przykład, wprowadzenie genu kodującego czynnik BDNF (ang. *Brain-derived Neurotrophic Factor*) do unieśmiertelnionych komórek mezenchymalnych, a następnie ich transplantacja do niedotlenionego mózgu szczura znacznie zmniejszyło obszar

uszkodzenia oraz poprawiło sprawność mózgu [30]. Podobny efekt neuroprotektoryjny i angiogeny wywołało dożylne podanie MSC poddanych transdukcji adenowirusem kodującym PIGF (ang. *Phosphatidylinositol Glycan*) [33]. Sun i wsp. uzyskali bardzo obiecujące wyniki stosując modyfikowane zestawem czterech genów komórki MDSC (ang. *Muscle-derived Stem Cells*) do terapii choroby Parkinsona u szczura [51]. Z kolei nerwowe komórki macierzyste (NCS) poddane genetycznej modyfikacji w wyniku wprowadzenia genu *NT-3* (ang. *Neurotrophin-3*), po implantacji w uszkodzonym obszarze rdzenia kręgowego znacznie poprawiały sprawność kończyn dolnych u gryzoni [54].

Pomimo prób zastosowania allogenicznych wysepek trzustkowych leczenie cukrzycy typu 1 ciągle wymaga bardziej efektywnych terapii. Zastosowanie komórek macierzystych z nadekspresją insuliny lub wyprowadzenie autologicznych linii komórek stabilnie produkujących ten hormon mogłoby w istotny sposób poprawić jakość życia pacjentów. Użycie ludzkich komórek mezenchymalnych pobranych ze szpiku kostnego, poprzez transdukcję wektorem adenowirusowym zawierającym gen *PDX1*, zaangażowanym w uruchomienie szlaku różnicowania progenitorowych komórek trzustki, umożliwiło uzyskanie stanu euglikemii u myszy (z doświadczalnie wywołaną cukrzycą) już w czasie dwóch tygodni.

Regeneracja mięśnia sercowego po przebytych zawałach ze względu na cywilizacyjny charakter tego schorzenia oraz jego skalę należy do jednego z wiodących nurtów w terapii komórkowej. Wspomniane wcześniej w niniejszej pracy modyfikacje genetyczne poprawiające przetrwanie transplantowanych komórek czy też promujące unaczynienie w miejscu niedokrwienia najczęściej pochodzą z badań prowadzonych w tym właśnie modelu. Osobną problematyką jest zastąpienie obszaru blizny pozawałowej mięśniowymi elementami kurczliwymi. Modyfikacje genowe mogą wspomóc powstawanie kardiomiocytów z nieodróżnionych komórek macierzystych (ES bądź MS), bądź też pomóc przystosować inne bardziej zaawansowane w różnicowaniu komórki macierzyste (progenitorowe) mięśni szkieletowych (mioblasty) do podjęcia funkcji w pozawałowym miokardium. W tym ostatnim przypadku zadaniem badawczym jest sprowokowanie, poprzez wymuszoną ekspresję białek odpowiedzialnych za tworzenie połączeń typu szczelinowego (koneksyna 43), elektrofizjologicznego sprzężenia pomiędzy komórkami transplantowanymi a kardiomiocytami [42]. Uzyskanie prawidłowego sprzężenia prawdopodobnie zapobiegłoby występowaniu arytmii obserwowanych podczas prób klinicznych prowadzonych z wykorzystaniem mioblastów [46, 47].

#### 4. Terapia przeciwnowotworowa

Wykazano, iż komórki mezenchymalne wykazują silny tropizm wobec litych guzów nowotworowych. Zjawisko to nie jest do końca wyjaśnione, jednak brany jest pod uwagę mechanizm chemotaksji, ponieważ komórki nowotworowe aktywnie wydzielają wiele chemokin (w tym SDF-1, HGF (ang. *Hepatocyte Growth Factor*), FGF i wiele innych), które potencjalnie mogą oddziaływać jako chemoatraktanty wobec komórek mezenchymalnych [39]. MSC dzięki swojemu tropizmowi mogą posłużyć jako elementy transportujące czynniki cytotoksyczne, cytokiny pobudzające odpowiedź immunologiczną czy też ligandy wyzwalające kaskady sygnałów pro-

apoptotycznych do miejsca docelowego. Wśród genetycznych modyfikacji MSC stosowanych w terapii przeciwnowotworowej wymienia się nadekspresję: INF- $\beta$  (ang. *Interferon-beta*) [51], CX3CL1 (ang. *Chemokine CX3 Motif Ligand 1*) [61], IL-12 [56]. MSC wykorzystano również do ekspresji dwuspecyficznego przeciwciała (ang. *Diabody*) skierowanego przeciw antygenowi karcynoembrionalnemu ( $\alpha$ -CEA) oraz antygenowi CD3 ( $\alpha$ CD3). Tak skonstruowane przeciwciała, wydzielane przez komórki mezenchymalne, aktywowało limfocyty T *in situ* i ograniczało rozwój guza w warunkach *in vivo* [6].

Interesującą propozycją było wykorzystanie MSC jako swoistych fabryk wektorów wirusowych dostarczających „geny samobójcze” (w tym przypadku opisywaną wcześniej wirusową kinazę tymidynową) do komórek nowotworowych. Po modyfikacji genetycznej MSC podawano do komory serca, które wykazując tropizm kumulowały się w tkance guza i produkując (lokalnie) wysokie stężenie wektorów wirusowych doprowadzały do transdukcji genem *HSV-tk in vivo* komórki nowotworowe, tym samym uwrażliwiając je na działanie gancyklowiru [56]. MSC mogą również w analogiczny sposób produkować cząsteczki wirusów onkolitycznych (testowanych przez ostatnie lata jako nowoczesne leki przeciwnowotworowe). Badania kliniczne wykazały bezpieczeństwo stosowania tych wirusów jednak ich efektywność *in vivo* pozostaje daleka od oczekiwań. Poprzez dostarczenie wirionów bezpośrednio do guza modyfikowane komórki mezenchymalne wykazują jednak znacznie większą skuteczność niż bezpośrednio podawanie wirusów [28]. Ostatnie doniesienia zalecają umieszczanie modyfikowanych komórek mezenchymalnych na nośnikach żelowych (ang. *Scaffolds*), aby zapobiec potencjalnemu, występującemu naturalnie, promowaniu przez MSC unaczynienia guza czy też wystąpienia przerzutów [10, 24].

Opracowywane są również terapie przeciwnowotworowe z wykorzystaniem zarodkowych komórek macierzystych. Na przykładzie terapii nowotworu mózgu (glejaka) przedstawiono schemat leczenia oparty na ekspresji z wykorzystaniem warunkowego promotora typu *tet-off* proapoptotycznego genu dla czynnika TRAIL (ang. *TNF-related Apoptosis Inducing Ligand*) umieszczonego w komórkach ES. Tak przygotowane komórki różnicowano *in vitro* w astrocyty i następnie podawano do myszy z wywołanym doświadczalnie guzem. Zaobserwowano znaczne zmniejszenie się objętości glejaka, masową apoptozę komórek nowotworowych, a po tygodniu od iniekcji, nasilającą się nekrozę z nielicznymi przetrwałymi komórkami rakowymi [12].

### III. PODSUMOWANIE

Podsumowując przedstawiony przegląd literatury na temat modyfikacji genetycznych komórek macierzystych należałoby podkreślić szeroki zakres prowadzonych badań. Zakładamy, że w komórkach macierzystych tkwi ogromny potencjał terapeutyczny jakkolwiek do rzeczywistego zastosowania ich w terapii medycznej należy przezwyciężyć jeszcze wiele trudności. Modyfikacje genetyczne mogą pomóc transplantowanym komórkom macierzystym przetrwać w miejscu implantacji,



wspomóc komórki macierzyste jako nośnik dla różnych czynników biologicznych, takich jak insulina w cukrzycy czy też dopamina w chorobie Parkinsona. Wprowadzane komórki mogą zregenerować zmienione patologicznie tkanki i narządy, naprawiać defekty spowodowane chorobami genetycznymi, poprawiać gojenie ran czy uszkodzenia kości i ścięgien, wspomagać krążenie krwi w warunkach niedokrwienia mózgu, serca czy kończyn, czy wreszcie stanowić terapię przeciwnowotworową. Lista chorób, w których możliwe jest wykorzystanie modyfikowanych komórek macierzystych, jest praktycznie nieograniczona. Wcześniej jednak należy dogłębnie poznać modyfikacje genetyczne wpływające na los komórki czy uzyskiwać wektory w taki sposób, aby były bezpieczne dla organizmu biorcy, a jednocześnie zapewniały optymalny efekt terapeutyczny dostarczając czynniki biologiczne. Wnioski wynikające z badań przedklinicznych będą stanowiły mocny argument, aby w niedalekiej przyszłości móc wprowadzić połączone terapie genowe z komórkowymi do aplikacji medycznej.

## LITERATURA

- [1] ARRUDA VR, FAVARO P, FINN JD. Strategies to Modulate Immune Responses: A New Frontier for Gene Therapy. *Mol Ther* 2009; **17**: 1492–1503.
- [2] BAGLIONI S, FRANCALANCI M, SQUECCO R, LOMBARDIA, CANTINI G, ANGELI R, GELMINI S, GUASTI D, BENVENUTI S, ANNUNZIATO F, BANI D, LIOTTA F, FRANCIANI F, PERIGLI G, SERIO M, LUCONI M. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J* 2009; **23**: 3494–3505.
- [3] BENABDALLAH BF, BOUCHENTOUF M, ROUSSEAU J, TREMBLAY JP. Over-expression of follistatin in human myoblasts increases their proliferation and differentiation, and improves the graft success in SCID mice. *Cell Transplant* 2009; pii: CT-1965 [Epub ahead of print].
- [4] CAO F, XIE X, GOLLAN T, ZHAO L, NARSINH K, LEE RJ, WU JC Comparison of Gene-Transfer Efficiency in Human Embryonic Stem Cells. *Mol Imaging Biol* 2009; Jun 24 [Epub ahead of print].
- [5] CHUANG CK, SUNG LY, HWANG SM, LO WH, CHEN HC, HU YC. Baculovirus as a new gene delivery vector for stem cell engineering and bone tissue engineering. *Gene Ther* 2007; **14**: 1417–1424.
- [6] COMPTE M, CUESTA AM, SÁNCHEZ-MARTÍN D, ALONSO-CAMINO V, VICARIO JL, SANZ L, ALVAREZ-VALLINA L. Tumor immunotherapy using gene-modified human mesenchymal stem cells loaded into synthetic extracellular matrix scaffolds. *Stem Cells* 2009; **27**: 753–760.
- [7] CORNILS K, LANGE C, SCHAMBACHA, BRUGMAN MH, NOWAK R, LIOZNOV M, BAUM C, FEHSE B. Stem cell marking with promotor-deprived self-inactivating retroviral vectors does not lead to induced clonal imbalance. *Mol Ther* 2009; **17**: 131–143.
- [8] DROBINSKAYA I, LINN T, SARIC T, BRETZEL RG, BOHLEN H, HESCHELER J, KOLOSSOV E. Scalable selection of hepatocyte- and hepatocyte precursor-like cells from culture of differentiating transgenically modified murine embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008; **26**: 2245–2256.
- [9] DZAU VJ, GNECCHI M, PACHORI AS. Enhancing stem cell therapy through genetic modification. *J Am Coll Cardiol* 2005; **46**: 1351–1353.
- [10] ELIOPOULOS N, FRANCOIS M, BOIVIN MN, MARTINEAU D, GALIPEAU J. Neo-organoid of marrow mesenchymal stromal cells secreting interleukin-12 for breast cancer therapy. *Cancer Res* 2008; **68**: 4810–4818.
- [11] EMSLEY JG, MITCHELL BD, KEMPERMANN G, MACKLIS JD. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 2005; **75**: 321–341.
- [12] GERMANO IM, UZZAMAN M, KELLER G. Gene delivery by embryonic stem cells for malignant glioma therapy: hype or hope? *Cancer Biol Ther* 2008; **7**: 1341–1347.

- [12] GHEISARI Y, SOLEIMANI M, AZADMANESH K, ZEINALI S. Multipotent mesenchymal stromal cells: optimization and comparison of five cationic polymer-based gene delivery methods. *Cytotherapy* 2008; **10**: 815–823.
- [13] GIARETTA I, MADEO D, BONAGURO R, CAPPELLARIA, RODEGHIERO F, GIORGIO P. A comparative evaluation of gene transfer into blood cells using the same retroviral backbone for independent expression of the EGFP and deltaLNGFR marker genes. *Haematologica* 2000; **85**: 680–689.
- [14] GONÇALVES MA, HOLKERS M, VAN NIEROP GP, WIERINGA R, PAU MG, DE VRIES AA. Targeted chromosomal insertion of large DNA into the human genome by a fiber-modified high-capacity adenovirus-based vector system. *PLoS One* 2008; **3**: e3084.
- [15] GUO Y, HANGOC G, BIAN H, PELUS LM, BROXMEYER HE. SDF-1/CXCL12 enhances survival and chemotaxis of murine embryonic stem cells and production of primitive and definitive hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 2005; **23**: 1324–1332.
- [16] HAGA K, LEMP NA, LOGG CR, NAGASHIMA J, FAURE-KUMAR E, GOMEZ GG, KRUSE CA, MENDEZ R, STRIPECKE R, KASAHARA N, CICCARELLI JC. Permanent, lowered HLA class I expression using lentivirus vectors with shRNA constructs: Averting cytotoxicity by alloreactive T lymphocytes. *Transplant Proc* 2006; **38**: 3184–3188.
- [17] HEDLUND E, PRUSZAK J, LARDARO T, LUDWIG W, VIÑUELA, KIM KS, ISACSON O. Embryonic stem cell-derived Pitx3-enhanced green fluorescent protein midbrain dopamine neurons survive enrichment by fluorescence-activated cell sorting and function in an animal model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2008; **26**: 1526–1536.
- [18] HELLEDIE T, NURCOMBE V, COOL SM. A simple and reliable electroporation method for human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2008; **17**: 837–848.
- [19] HIRSCH T, SPIELMANN M, VELANDER P, ZUHAILI B, BLEIZIFFER O, FOSSUM M, STEINSTRASSER L, YAO F, ERIKSSON E. Insulin-like growth factor-1 gene therapy and cell transplantation in diabetic wounds. *J Gene Med* 2008; **10**: 1247–1252.
- [20] HOU Y, MAO Z, WEI X, LIN L, CHEN L, WANG H, FU X, ZHANG J, YU C. Effects of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor 165 gene transfer on Achilles tendon healing. *Matrix Biol* 2009; **28**: 324–335.
- [21] KAMOCHI H, KUROKAWA MS, YOSHIKAWA H, UEDA Y, MASUDA C, TAKADA E, WATANABE K, SAKAKIBARA M, NATUKI Y, KIMURA K, BEPPU M, AOKI H, SUZUKI N. Transplantation of myocyte precursors derived from embryonic stem cells transfected with *IGFII* gene in a mouse model of muscle injury. *Transplantation* 2006; **82**: 516–526.
- [22] KANNO S, KIM PK, SALLAM K, LEI J, BILLIAR TR, SHEARS LL 2ND. Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 12277–12281.
- [23] KARNOUB AE, DASH AB, VO AP, SULLIVAN A, BROOKS MW, BELL GW, RICHARDSON AL, POLYAK K, TUBO R, WEINBERG RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; **449**: 557–563.
- [24] KAZEMI S, WENZEL D, KOLOSSOV E, LENKAN, RAIBLE A, SASSE P, HESCHELER J, ADDICKS K, FLEISCHMANN BK, BLOCH W. Differential role of bFGF and VEGF for vasculogenesis. *Cell Physiol Biochem* 2002; **12**: 55–62.
- [25] KIM DW, CHUNG S, HWANG M, FERREE A, TSAI HC, PARK JJ, CHUNG S, NAM TS, KANG UJ, ISACSON O, KIM KS. Stromal cell-derived inducing activity, Nurr1, and signaling molecules synergistically induce dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006; **24**: 557–567.
- [26] KODE JA, MUKHERJEE S, JOGLEKAR MV, HARDIKAR AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* 2009; **11**: 377–391.
- [27] KOMAROVA S, KAWAKAMI Y, STOFF-KHALILI MA, CURIEL DT, PEREBOEVA L. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther* 2006; **5**: 755–766.
- [28] KOSAKA Y, KOBAYASHI N, FUKAZAWA T, TOTSUGAWA T, MARUYAMA M, YONG C, ARATA T, IKEDA H, KOBAYASHI K, UEDA T, KURABAYASHI Y, TANAKA N. Lentivirus-based gene delivery in mouse embryonic stem cells. *Artif Organs* 2004; **28**: 271–277.
- [29] KUROZUMI K, NAKAMURA K, TAMIYA T, KAWANO Y, KOBUNE M, HIRAI S, UCHIDA H, SASAKI K, ITO Y, KATO K, HONMOU O, HOUKIN K, DATE I, HAMADA H. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther* 2004; **9**: 189–197.

- [30] LAKSHMIPATHY U, PELACHO B, SUDO K, LINEHAN JL, COUCOUVANIS E, KAUFMAN DS, VERFAILLIE CM. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells* 2004; **22**: 531–543.
- [31] LAVON N, YANUKA O, BENVENISTY N. The effect of overexpression of Pdx1 and Foxa2 on the differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic cells. *Stem Cells* 2006; **24**: 1923–1930.
- [32] LEE M. Hypoxia targeting gene expression for breast cancer gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; **61**: 842–849.
- [33] LI Y, ZHANG R, QIAO H, ZHANG H, WANG Y, YUAN H, LIU Q, LIU D, CHEN L, PEI X. Generation of insulin-producing cells from PDX-1 gene-modified human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2007; **211**: 36–44.
- [34] LIU H, HONMOU O, HARADA K, NAKAMURA K, HOUKIN K, HAMADA H, KOCSIS JD. Neuroprotection by PIGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischaemia. *Brain* 2006; **129**: 2734–2745.
- [35] LIU J, JONES KL, SUMER H, VERMA PJ. Stable transgene expression in human embryonic stem cells after simple chemical transfection. *Mol Reprod Dev* 2009; **76**: 580–586.
- [36] PALMER GD, STEINERT A, PASCHERA, GOUZE E, GOUZE JN, BETZ O, JOHNSTONE B, EVANS CH, GHIVIZZANI SC. Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells *in vitro*. *Mol Ther* 2005; **12**: 219–228.
- [37] PAPETA N, CHEN T, VIANELLO F, GERERTY L, MALIK A, MOK YT, THARP WG, BAGLEY J, ZHAO G, STEVCEVAL, YOON V, SYKES M, SACHS D, IACOMINI J, POZNANSKY MC. Long-term survival of transplanted allogeneic cells engineered to express a T cell chemorepellent. *Transplantation* 2007; **83**: 174–183.
- [38] PHILLIPS MI, TANG YL. Genetic modification of stem cells for transplantation. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; **60**: 160–172.
- [39] PONS J, HUANG Y, TAKAGAWA J, ARAKAWA-HOYT J, YE J, GROSSMAN W, KAN YW, SU H. Combining angiogenic gene and stem cell therapies for myocardial infarction. *J Gene Med* 2009; **11**: 743–753.
- [40] RODRIGUEZ RT, VELKEY JM, LUTZKO C, SEERKE R, KOHN DB, O'SHEA KS, FIRPO MT. Manipulation of OCT4 levels in human embryonic stem cells results in induction of differential cell types. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; **232**: 1368–1380.
- [41] ROELL W, LEWALTER T, SASSE P, TALLINI YN, CHOI BR, BREITBACH M, DORAN R, BECHER UM, HWANG SM, BOSTANI T, VON MALTZAHN J, HOFMANN A, REINING S, EIBERGER B, GABRIS B, PFEIFER A, WELZ A, WILLECKE K, SALAMA G, SCHRICKEL JW, KOTLIKOFF MI, FLEISCHMANN BK. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature* 2007; **450**: 819–824.
- [42] SAKURAI F. Development and evaluation of a novel gene delivery vehicle composed of adenovirus serotype 35. *Biol Pharm Bull* 2008; **31**: 1819–1825.
- [43] SHI Y, HOU L, TANG F, JIANG W, WANG P, DING M, DENG H. Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid. *Stem Cells* 2005; **23**: 656–662.
- [44] SHIMIZU N, WATANABE H, KUBOTA J, WU J, SAITO R, YOKOI T, ERA T, IWATSUBO T, WATANABE T, NISHINA S, AZUMA N, KATADA T, NISHINA H. Pax6-5a promotes neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. *Biol Pharm Bull* 2009; **32**: 999–1003.
- [45] SIMINIAK T, FISZER D, JERZYKOWSKA O, GRYGIELSKA B, ROZWADOWSKA N, KALMUCKI P, KURPISZ M. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. *Eur Heart J* 2005; **26**: 1188–1195.
- [46] SIMINIAK T, KALAWSKI R, FISZER D, JERZYKOWSKA O, RZEŹNICZAK J, ROZWADOWSKA N, KURPISZ M. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004; **148**: 531–537.
- [47] SMITH-ARICA JR, THOMSON AJ, ANSELL R, CHIORINI J, DAVIDSON B, MCWHIR J. Infection efficiency of human and mouse embryonic stem cells using adenoviral and adeno-associated viral vectors. *Cloning Stem Cells* 2003; **5**: 51–62.
- [48] STENDER S, MURPHY M, O'BRIEN T, STENGAARD C, ULRICH-VINTHER M, SØBALLE K, BARRY F. Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 2007; **13**: 93–99.

- [49] STRULOVICI Y, LEOPOLD PL, O'CONNOR TP, PERGOLIZZI RG, CRYSTAL RG. Human embryonic stem cells and gene therapy. *Mol Ther* 2007; **15**: 850–866.
- [50] STUDENY M, MARINI FC, CHAMPLIN RE, ZOMPETTA C, FIDLER IJ, ANDREEFF M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 2002; **62**: 3603–3608.
- [51] SUN M, KONGL L, WANG X, HOLMES C, GAO Q, ZHANG GR, PFEILSCHIFTER J, GOLDSTEIN DS, GELLER AI. Coexpression of tyrosine hydroxylase, GTP cyclohydrolase I, aromatic amino acid decarboxylase, and vesicular monoamine transporter 2 from a helper virus-free herpes simplex virus type 1 vector supports high-level, long-term biochemical and behavioral correction of a rat model of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 2004; **15**: 1177–1196.
- [52] TABATA Y, OUCHI Y, KAMIYA H, MANABE T, ARAI K, WATANABE S. Specification of the retinal fate of mouse embryonic stem cells by ectopic expression of Rx/rax, a homeobox gene. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 4513–4521.
- [53] TANG X, CAI PQ, LIN YQ, OUDEGA M, BLITS B, XU L, YANG YK, ZHOU TH. Genetic engineering neural stem cell modified by lentivirus for repair of spinal cord injury in rats. *Chin Med Sci J* 2006; **21**: 120–124.
- [54] TOYAMA K, HONMOU O, HARADA K, SUZUKI J, HOUKIN K, HAMADA H, KOCSIS JD. Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Exp Neurol* 2009; **216**: 47–55.
- [55] UCHIBORI R, OKADA T, ITO T, URABE M, MIZUKAMI H, KUME A, OZAWA K. Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy. *J Gene Med* 2009; **11**: 373–381.
- [56] VASSALLI G, ROEHRICH ME, VOGT P, PEDRAZZINI GB, SICLARI F, MOCCHETTI T, VON SEGESSER LK. Modalities and future prospects of gene therapy in heart transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2009; **35**: 1036–1044.
- [57] VETERE A, MARSICH E, DI PIAZZA M, KONCAN R, MICALI F, PAOLETTI S. Neurogenin3 triggers beta-cell differentiation of retinoic acid-derived endoderm cells. *Biochem J* 2003; **371**: 831–841.
- [58] VRANCKX JJ, HOELLER D, VELANDER PE, THEOPOLD CF, PETRIE N, TAKEDO A, ERIKSSON E, YAO F. Cell suspension cultures of allogenic keratinocytes are efficient carriers for *ex vivo* gene transfer and accelerate the healing of full-thickness skin wounds by overexpression of human epidermal growth factor. *Wound Repair Regen* 2007; **15**: 657–664.
- [59] WANG B, LI J, FU FH, CHEN C, ZHU X, ZHOU L, JIANG X, XIAO X. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Ther* 2008; **15**: 1489–1499.
- [60] XIN H, SUN R, KANEHIRA M, TAKAHATA T, ITOH J, MIZUGUCHI H, SAIJO Y. Intratracheal Delivery of CX3CL1-expressing Mesenchymal Stem Cells to Multiple Lung Tumors. *Mol Med* 2009; **15**: 321–327.
- [61] YAN MN, DAI KR, TANG TT, ZHU ZA, LOU JR. Reconstruction of peri-implant bone defects using impacted bone allograft and BMP-2 gene-modified bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* 2009; Jun 30 [Epub ahead of print]
- [62] YANG F, GREEN JJ, DINIO T, KEUNG L, CHO SW, PARK H, LANGER R, ANDERSON DG. Gene delivery to human adult and embryonic cell-derived stem cells using biodegradable nanoparticulate polymeric vectors. *Gene Ther* 2009; **16**: 533–546.
- [63] YU JX, HUANG XF, LV WM, YE CS, PENG XZ, ZHANG H, XIAO LB, WANG SM. Combination of stromal-derived factor-1alpha and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization. *J Vasc Surg* 2009; **50**: 608–616.
- [64] ZENG B, CHEN H, ZHU C, REN X, LIN G, CAO F. Effects of combined mesenchymal stem cells and heme oxygenase-1 therapy on cardiac performance. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008; **34**: 850–856.
- [65] ZENG X, RAO MS. Controlled genetic modification of stem cells for developing drug discovery tools and novel therapeutic applications. *Curr Opin Mol Ther* 2008; **10**: 207–213.
- [66] ZHOU YF, YANG XJ, LI HX, HAN LH, JIANG WP. Mesenchymal stem cells transfected with HCN2 genes by LentiV can be modified to be cardiac pacemaker cells. *Med Hypotheses* 2007; **69**: 1093–1097.

Prof. dr hab. Maciej Kurpisz  
 Instytut Genetyki Człowieka PAN  
 ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań  
 e-mail: kurpimac@man.poznan.pl