

Vinger achter gentherapie

Drie keer sneller dan voorheen en veel nauwkeuriger genen modificeren in planten- en zoogdiercellen. Dat kan met zinkvingers. Een waaier aan toepassingen ligt in het verschiet: van productievare cellijnen voor biotechmedicijnen tot mogelijk veiligere gentherapie.

Door Els van den Brink en Martine Segers, gepubliceerd in C2W Life Sciences op 7 maart 2009

“Het is echt een doorbraak. Er is geen andere techniek met zo’n hoge efficiëntie en tegelijkertijd zo’n hoge specificiteit”, zegt Thierry Vandendriessche, hoogleraar gentherapie aan de K.U.Leuven. Hij praat enthousiast over een steeds volwassenere wordende technologie op basis van zogenoemde zinkvingernucleases. Daarmee zijn de succeschansen bij de genetische modificatie van zoogdier- en plantencellen te verhogen van de gebruikelijke 0,0001 procent naar 1 tot 20 procent.

De tijd die nodig is om een gen succesvol uit te schakelen of een nieuw gen in te voegen neemt ook nog eens af van 6 naar 2 maanden. En dit alles met een ongekennde precisie, volgens Sigma Aldrich, dat de technologie sinds vorig jaar op de markt brengt onder de naam CompoZR.

Genetische modificatie bij zoogdier- en plantencellen is tot nu toe vooral een traag proces, omdat het afhankelijk is van weinig voorkomende spontane processen in de cel. De traditionele manier om een nieuw gen in een planten- of een zoogdiercel te brengen, is de introductie van een stuk DNA dat gedeeltelijk overeenkomt met het gen waarin het moet integreren. Daarna is het een kwestie van wachten tot de gewenste spontane dubbelstrengsbreuk ontstaat. De kans daarop is minimaal, hooguit één op 1 miljoen. Als de breuk eenmaal ontstaat, kan het stuk DNA in het genoom integreren door middel van zogenoemd homologe recombinatie.

De zinkvinger-nucleasetechnologie biedt nu de mogelijkheid om plaatsgericht zo’n dubbelstrengsbreuk aan te brengen. “De kans op een dubbelstrengsbreuk is altijd de bottleneck geweest. Die is nu verdwenen”, zegt Bert van der Zaal, plantenonderzoeker bij de sectie Moleculaire

Ontwikkelingsgenetica aan de Universiteit Leiden. Het geheim van de technologie zit in een slimme combinatie van twee verschillende eiwitdomeinen, een zinkvinger en een nuclease.

Terwijl een nuclease DNA kan knippen op elke willekeurige locatie, onafhankelijk van de DNA-basenpaarvolgorde, zorgt de zinkvinger - een eiwit met een vingerachtige structuur rondom een zink-ion - er juist voor dat een eiwit alleen aan DNA bindt, dat bestaat uit een specifieke serie nucleotiden.

Met de combinatie van deze twee eiwitdomeinen - van de zinkvingers bestaan meer dan honderd varianten die verschillende unieke nucleotidesequenties herkennen - is een eiwitcomplex op maat te maken dat DNA knipt op een heel specifieke locatie. Zo landt een nieuw gen niet meer op een willekeurige locatie in het genoom, maar precies op de plek waar een onderzoeker dat wil.

Ongelukjes

“Je speelt dankzij de zinkvingers geen Russische roulette meer bij bijvoorbeeld gentherapie”, licht Vandendriessche toe. “Tot nu toe konden proefpersonen de pech hebben dat de kogel op het verkeerde moment in de lader zat. Dan krijg je kanker door de gentherapie.” Dat kan gebeuren als het ingebrachte gen per ongeluk op een hele ongelukkige plek terechtkomt, bijvoorbeeld midden in een nuttig gen dat - als het niet beschadigd is - tegen het ontstaan van kanker beschermt.

Ook als je in een bioreactor met zoogdiercellen meer medicinaal antilichaam wilt produceren, biedt de zinkvingernucleasetechnologie voordelen, meent Marco van den Berg van het DSM Biotechnology Centre. “Daarmee kun je het antilichaamgen specifiek laten integreren op een stabiele plek in het genoom waar de transcriptieniveaus van nature hoog zijn. Daarnaast is het ook een pré dat je niet meer per ongeluk bestaande, voor de productie nuttige genen in je cellijn uitschakelt.”

Het vroegtijdig opsporen van bijwerkingen van medicijnen is nog een andere toepassing, zegt de Vlaamse Tom Van Cauteren, sales manager bij Sigma Aldrich. De farmaceutische industrie kan er namelijk cellijnen mee creëren zonder het gen waarvoor een bepaald medicijn is bedoeld. Daarmee kan ze controleren wat dit medicijn doet in afwezigheid van het betreffende gen.

Antibioticaresistentie

De veelgeplaaide selectiemarkers – waarmee is na te gaan of een genetische modificatie is uitgevoerd – kunnen dankzij de zinkvingertechnologie in de prullenbak, als het aan Van Cauteren ligt. BIJ planten zijn resistentiegenen tegen antibiotica bijvoorbeeld veelgebruikt. Door een extra resistentiegen toe te voegen aan het genconstruct tijdens de genetische modificatie, en vervolgens antibiotica toe te dienen, kunnen onderzoekers snel zien in welke cellen de genetische modificatie is gelukt. Bij lage slagingskansen is dat haast een must. Nu met zinkvingers de locatie van een gen makkelijk is te bepalen, is controle ook mogelijk door simpelweg het DNA van een aantal monsters te sequencen. “Selectiemarkers kunnen andere processen in de cel flink verstoren. Het is een groot voordeel als je die kan weglaten, vooral voor medische toepassingen. Dan blijven de originele cellijnen intact en dat biedt mogelijkheden voor veiligere gentherapie in stamcellen”, stelt Van Cauteren.

Openbaar

In principe is het mogelijk om zinkvinger nucleases zelf te maken, zoals universitair plantenonderzoeker Van der Zaal en kankeronderzoeker Marianne Rots (Universitair Medisch Centrum Groningen) doen. De selectie van de juiste zinkvingers kan echter veel tijd kosten. Onderzoekers voor wie tijd een groter probleem is dan geld, kunnen sinds vorig jaar gebruik maken van de diensten van Sigma Aldrich. Dat heeft hiervoor een overeenkomst gesloten met Sangamo Biosciences, een Amerikaans biotechbedrijf dat het merendeel van de patenten op het gebied van de zinkvinger-nucleasetechnologie in handen heeft. Op verzoek van klanten kan Sigma Aldrich binnen 2 maanden een specifieke zinkvinger-nuclease ontwerpen en valideren. Kosten voor onderzoeksdoeleinden: zo'n 30.000 dollar.

Voor meer armlastige onderzoekers biedt het Zinc Finger Consortium mogelijkheden. Dit consortium is een samenwerkingsverband van wetenschappers van verschillende universiteiten en instellingen, dat enkele jaren geleden is opgericht om tegenwicht te bieden aan het monopolie van Sangamo. Het Zinc Finger Consortium heeft een alternatieve methode ontwikkeld, die onder de naam OPEN (Oligomerized Pool Engineering) vrij beschikbaar is.

De kern van OPEN is een speciaal computerprogramma voor het ontwerp van zinkvingercombinaties en een bacterieel testsysteem om de optimale combinatie te bepalen uit een bibliotheek van zinkvingers. De voorspellende waarde daarvan is echter beperkt, omdat in bacteriën het DNA niet zoals in zoogdiercellen is gemethyleerd en gewikkeld rondom histonen. De efficiëntie van de resulterende zinkvingers zal het daardoor niet altijd halen bij die van de commerciële variant.

Diabetes

Voor DSM zijn de hoge licentiekosten van de commerciële variant een van de redenen om niet met de zinkvingers aan de slag te gaan. Maar misschien gaat het bedrijf dat in de toekomst wel doen. “We beoordelen bij nieuwe projecten iedere keer opnieuw of er genoeg voordelen zijn die opwegen tegen de kosten voor een licentie op de technologie”, stelt Van den Berg. “Tot nu toe was dat voor onze toepassingen nog niet het geval.”

Diverse andere bedrijven zijn wel al overtuigd van de voordelen en hebben overeenkomsten gesloten met Sangamo. De farmaceutische bedrijven Pfizer en Roche willen de technologie gebruiken voor de ontwikkeling van transgene dieren en cellijnen voor de productie van recombinante eiwitten en antilichamen. Pfizer wil bijvoorbeeld een in het verleden gebruikte selectiemarkers achteraf alsnog uitschakelen in cellijnen. Dow Agrosiences onderzoekt samen met Sangamo de toepassingsmogelijkheden bij planten.

Zelf is Sangamo bezig met verschillende klinische trials. Onderzoek naar een middel bij diabetes is in de tweede fase, terwijl voor een middel tegen HIV onlangs een klinische trial fase I werd opgestart. In de laatste therapie schakelt een zinkvingernuclease een CCR5-receptor uit die HIV gebruikt om cellen

binnen te komen. Door deze receptor in beenmergcellen van patiënten uit te schakelen, worden zij 'resistent' tegen het virus.

Absoluut

Belangrijkste struikelblok voor een brede toepassing van de zinkvingers voor gentherapie is dat nog steeds niet alle cellen gemodificeerd worden, ook al is de efficiëntie flink hoger dan voorheen. "Bij erfelijke, aangeboren afwijkingen van het immuunsysteem, ook wel SCID genoemd, is het goed genoeg als er een gen gerepareerd wordt in een paar procent van de via een punctie verkregen beenmergcellen van een patiënt. Bij bijvoorbeeld sikkelcelanemie heb je gencorrectie in veel meer cellen nodig, zeker in 30 procent", licht Vandendriessche toe.

Andere onderzoekers plaatsen kanttekeningen bij de specificiteit van de zinkvingers. "De vraag is hoe je kunt controleren of een zinkvinger-nuclease alleen op de bedoelde plaats heeft geknipt. Stel dat er op een andere plek alleen twee nucleotiden zijn verwijderd, hoe kom je daar ooit achter?" vraagt plantenwetenschapper Van der Zaal zich af. De Groningse Rots voegt daar aan toe: "Het is bekend dat de nucleases ook kunnen dimeriseren met een nuclease dat nog vrij rondzwemt. Daardoor kunnen ze op veel meer verschillende plaatsen knippen."

Vanwege haar twijfels koppelt Rots de zinkvingers zelf meestal aan andersoortige restrictie-enzymen die DNA alleen knippen op een specifieke sequentie, of enzymen die de aflezing van het DNA onderdrukken. De Leuvense hoogleraar Vandendriessche is positiever: "In de natuur is niks absoluut. Maar er is al veel vooruitgang geboekt op dit gebied."

****Toelichting bij infografiek:

Zinkvingers en nucleases samen in actie

DNA dat codeert voor een zinkvingernuclease wordt via een virus of transfectiereagens een cel ingebracht. Eenmaal door de cel geproduceerd, beweegt de zinkvingernuclease zelf naar de celkern. Daar kan het binden op de juiste locatie in het genoom om het DNA te knippen.

Wie een gen wil uitschakelen, knipt specifiek dat gen doormidden. De cel kan deze breuk laten repareren door een DNA-ligase, een natuurlijk reparatiemechanisme dat ook wel non-homologous end joining wordt genoemd. Omdat dit proces niet optimaal werkt, wordt in 1 tot 20 procent van de gevallen het gewenste gen uitgeschakeld.

Het is ook mogelijk een nieuw gen te introduceren volgens de traditionele aanpak van homologe recombinatie. Daarvoor kun je de nucleases laten knippen op een gunstige plek in het genoom, bijvoorbeeld op een plek die gereguleerd wordt door een goede promotor. De kans op succes ligt daarbij ook tussen de 1 en 20 procent. Wie zo'n goede plek vindt, hoeft geen genconstruct meer te bouwen dat zowel codeert voor het gewenste eiwit als voor de benodigde regulatiemoleculen. Alleen het gewenste eiwitgen is dan voldoende.