

JACEK BŁĄŻEWICZ, PIOTR ŁUKASIAK

*Instytut Informatyki
Politechnika Poznańska
Piotrowo 2, 60-965 Poznań
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
E-mail: Jacek.Blazewicz@cs.put.poznan.pl
Piotr.Lukasiak@cs.put.poznan.pl*

SYSTEM WSPOMAGANIA WYTWARZANIA I ANALIZ SZCZEPIONEK GENETYCZNYCH

WSTĘP

Wynalezienie szczepionek i związany z tym rozwój szczepień ochronnych był przełomowym momentem w dziejach ludzkiej cywilizacji i jednym z najważniejszych osiągnięć nowożytnej medycyny. Pierwsze udokumentowane próby przeciwdziałania zachorowalności na choroby zakaźne pojawiły się już w Chinach w X w., gdzie wcierano małym dzieciom w błonę śluzową nosa utłuczone na proszek strupy po ospie. W Indiach również stosowano podobną profilaktykę, polegającą na zakładaniu dzieciom ubrań po chorych na ospę lub wkłuwano igły zakaźne ropą pobraną od chorych. Nieco później, w Turcji, niewolnikom przeznaczonym do haremów, za pomocą małego nożyka robiono nacięcie i wprowadzano odrobinę ropy z pęcherzy ospowych. Usystematyzowane szczepienia przeciw ospie prawdziwej, polegające na nakłuwaniu żyły igłą uprzednio zanurzoną w ospowatej ropie, wkraczają do Europy w XVIII w. Metoda ta nosi nazwę wariolizacji (łac. *variola vera* – ospa prawdziwa). Jednak obecna nazwa dziedziny nauk medycznych, zajmującej się szczepieniami ochronnymi, zwanej wakcynologią, pochodzi od eksperymentów wykonanych przez Edwarda Jennera podczas badań nad ospą prawdziwą, który wykorzystał powszechne przekonanie, iż osoba, która zapadła i przeszła tzw. ospę krowiankę (łac. *variola vaccina*), nie zachoruje już na ospę prawdziwą. Aczkolwiek te

badania były wykonywane świadomie, jednak przeprowadzane one były bez znajomości podstaw immunologicznych tych zjawisk. Sformułowanie ogólnych praw związanych ze szczepieniami, jak i odkrycie metody „odzjadliwiania” bakterii, zostało po raz pierwszy dokonane przez Ludwika Pasteura pod koniec XIX w., który wynalazł szczepionkę m.in. przeciwko wąglikowi, różycy i wścieklicznie. Od tego momentu możemy mówić o powstaniu immunologii (JAKÓBISIAK 2002). Przez cały XX w., na całym świecie naukowcy intensywnie pracowali nad stworzeniem szczepionek przeciw różnego rodzaju bakteriom, jednak pomimo ich wysiłków, w kilku przypadkach uwieńczonych pełnym sukcesem, nadal istnieje wiele wirusów, przeciwko którym ludzkość z jej obecnym stanem wiedzy jest bezsilna. Dzięki szczepieniom ochronnym człowiek opanował już wiele chorób zakaźnych. Są nimi: odra, ospa, tężec, tyfus, choroba Heinego-Medina, wirusowe zapalenie wątroby typu A i B (ERTL 1996). Od końca XX w. postęp w dziedzinie nauk biologicznych został połączony z rozwojem nauk ścisłych wspomaganym przez coraz bardziej zaawansowane maszyny obliczeniowe. Wynikiem tego mariażu jest nauka zwana bioinformatyką, która coraz wyraźniej zaznacza swoje istnienie również w dziedzinie immunologii. Pojawienie się coraz bardziej odpornych wirusów charakteryzujących się

np. hiperzmiennością antygenową i oddziaływaniem z układem odpornościowym (HIV), które umykają prostym analizom powoduje, iż wspomaganie procesów opracowywania nowych szczepionek za pomocą nauk obli-

zeniowych, umożliwiających szybką i pełną analizę ogromnej ilości danych, staje się niezbędnym warunkiem przetrwania rodzaju ludzkiego.

RODZAJE SZCZEPIONEK

Szczepionka zawiera w sobie martwe lub osłabione patogeny lub ich fragmenty. Patogeny, to czynniki chorobotwórcze (np. wirusy, bakterie, pasożyty). Gdy do organizmu człowieka dostanie się odpowiednia „dawka” patogenów w formie szczepionek, układ odpornościowy uczy się walczyć z takim patogenem, by na przyszłość nie zostać zaskoczonym i umieć się obronić. Zależnie od tego, jakie zostaną użyte patogeny, taka zostanie pobudzona odpowiedź immunologiczna (JAKÓBISIAK 2002).

Każda szczepionka dopuszczona do stosowania powinna spełniać szereg określonych wymagań (PIEKAROWICZ 2004):

- powinna zapobiegać chorobie, a niekoniecznie zakażeniu;
- nabyta odporność, najlepiej po jednorazowym podaniu szczepionki, powinna trwać jak najdłużej, najlepiej przez całe życie;
- indukcja właściwej dla danego typu wirusa odpowiedzi immunologicznej, która powinna być tego samego typu, jak występująca w czasie zakażenia dzikim typem wirusa;
- szczepionka powinna wywoływać minimalne objawy uboczne

Szczepionka powinna też charakteryzować się stabilnością, szczególnie niewrażliwo-

ścią na podwyższoną temperaturę, łatwością transportu i przechowywania, jak również prostym sposobem podania.

Szczepionki konwencjonalne dzieli się na trzy podstawowe grupy:

- szczepionki zawierające żywe atenuowane (unieszkodliwione) wirusy,
- szczepionki zawierające zabite wirusy,
- szczepionki podjednostkowe, w których skład wchodzi specjalne białka wirusowe lub ich części.

Jednak szczepionki konwencjonalne mają swoje wady:

- nie zawsze są skuteczne; są choroby, na które szczepionki nie działają;
- szczepionki mogą nie aktywować wystarczającej odpowiedzi immunologicznej;
- odporność może być krótkotrwała, wówczas szczepienie trzeba powtarzać co jakiś czas;
- mogą być niebezpieczne, dlatego, że groźny, osłabiony patogen (np. wirus), użyty w szczepionce, może ulec mutacji i zaatakować organizm;
- mogą wywoływać alergię lub być szkodliwe dla organizmu przez zawarte w nich zanieczyszczenia i niepotrzebne substancje (JAKÓBISIAK 2002).

SZCZEPIONKI GENETYCZNE

Terapia genowa jest stosowana u ludzi od zaledwie 10 lat. Przełomem było użycie odpowiednio spreparowanych wirusów, jako posłańców wprowadzających do komórki geny lecznicze, które zastępowały jej własne uszkodzone geny albo przydawały jej jakąś istotną cechę (np. aby była rozpoznawana przez układ immunologiczny). Cały proces odbywa się zazwyczaj *in vitro*, czyli poza ustrojem człowieka, później zaś takie naprawione komórki wstrzykiwane są do ludzkiego organizmu (Belakova 2007).

Niezwykle interesujące perspektywy stwarzają szczepionki genetyczne, które będą zmuszać DNA do produkcji odpowiednich

białek, wywołujących odporność. Wstępne próby na myszach dały bardzo obiecujące wyniki, nawet wobec charakteryzujących się szybkimi mutacjami wirusów grypy (SCHNEIDER i MOHR 2003).

Wirusowe systemy transferu genów wykorzystują unikatowe, biologiczne właściwości wirusów. W normalnych warunkach we wnętrzu otoczki wirusów znajduje się ich własny materiał genetyczny w postaci DNA lub RNA. Wirus wnikając do komórki docelowej uwalnia swój materiał genetyczny, który służy jako matryca do produkcji kolejnych wirusów (replikacja). Zainfekowana komórka powiela materiał genetyczny

wirusa, syntetyzuje jego białka strukturalne, a następnie składa kolejne kompletne cząsteczki patogenu. Wirusowe systemy transferu genów to rekombinowane wirusy zawierające wewnątrz otoczki sekwencje terapeutyczne, które zastępują geny kodujące samego wirusa. Idealny, wirusowy system transferu genów powinien charakteryzować się takimi cechami jak: wysokie miano (liczba cząsteczek rekombinowanego wirusa w jednostce objętości), prosty system produkcji, możliwość dostarczania materiału genetycznego o dużych rozmiarach, precyzyjne i stabilne wprowadzenie genu terapeutycznego, brak immunogenności (HOFFMAN i współaut. 1997). Cały czas trwają prace nad udoskonaleniem istniejących wirusowych systemów transferu genów, które charakteryzowałyby się wszystkimi wyżej wymienionymi cechami. Aktualnie nie dysponuje się jednym uniwersalnym nośnikiem wirusowym, a powyższe cechy charakteryzują różne systemy wektorów (nośników) (PEACHMAN i współaut. 2003).

Być może szczepionki tradycyjne nigdy nie będą w stanie poradzić sobie zarówno z grypą, jak i innymi chorobami zakaźnymi. Dlatego też od początku lat 90. naukowcy pracują nad szczepionkami genowymi. Pierwsze próby kliniczne przeprowadzono w 1995 r., kiedy to plazmid zawierający gen HIV podano pacjentom już zarażonym (COSTA i współaut. 1998). Obecnie przeprowadza się badania nad szczepionkami mogącymi zapobiegać zakażeniom (np. HIV, wirusów opryszczki, grypy, wirusowego zapalenia wątroby typu B, malarii), mogącymi wzmacniać osłabioną odporność chorych zakażonych HIV i leczyć nowotwory. Z patogenu pobiera się jeden lub kilka genów, które kodują antygeny (białko, które organizm może rozpoznać i uznać za „własne” bądź „cudze”, w tym drugim przypadku dając sygnał do zniszczenia patogenu z tym antygenem). Geny te włącza się w plazmidy, kolistę cząsteczkę DNA pobrane od nieszkodliwych bakterii. Spełniają one rolę wektorów (cząsteczek-przenośników), które transportują włączone w nie geny do komórek ciała ludzkiego (REYES-SANDOVAL i ERTL 2001). By wprowadzić szczepionkę do organizmu, używa się strzykawek, pistoletów genowych, aerozolu bądź kropli do nosa (DANKO i WOLFF 1994). Najczęściej badania dotyczące szczepionek DNA prowadzi się przez wstrzyknięcie domięśniowe (DNA rozpuszczone w roztworze soli

fizjologicznej) lub śródskórne. Stosuje się też kompleksy DNA-lipid, które w podaniu dożylnym wykazują większą ekspresję (produkcję antygenów) niż w podaniu domięśniowym. W ostatnim czasie zaczęto podawać DNA w formie aerozolu i uznano, że najlepsze wyniki uzyskuje się przy wykorzystaniu ich do leczenia chorób dróg oddechowych. Kolejnym sposobem jest podawanie kulek złota mikroskopijnej wielkości, opłaszczonych DNA (metoda „gene gun”) (MANOJ i współaut. 2004).

Szczepionki genetyczne charakteryzują się następującymi cechami (KOFTA i WĘDRYCHOWICZ 2001):

- wywołują silną odpowiedź immunologiczną;
- są bezpieczne – nie niosą zagrożenia ze strony patogenu – do plazmidu wprowadza się tylko geny odpowiedzialne za produkcję antygenów; brak jest tam genów mogących odtworzyć patogen – czynnik chorobotwórczy, zarażający organizm;
- są przydatne w uodparnianiu niemowląt – zawiodą tu tradycyjne szczepionki, gdyż immunoglobuliny pochodzące od matki wiążą drobnoustroje ze szczepionek, hamując możliwość rozwinięcia się odpowiedzi immunologicznej (SIEGRIST 1997);
- mogą zapewnić odporność przeciwko kilku szczepom patogenów jednocześnie, jeżeli do plazmidu wszczepi się geny pochodzące od różnych szczepów patogenów;
- są w stanie wywołać zarówno odpowiedź komórkową jak i humoralną;
- są silnie immunogenne – mogą pobudzić mechanizmy odpornościowe, odmienne od naturalnej odpowiedzi immunologicznej;
- antygen powstający w organizmie immunizowanego osobnika jest identyczny do naturalnego białka patogenu;
- DNA jest trwale i termostabilne – nie wymaga utrzymywania niskich temperatur podczas transportu i przechowywania.

Do tej pory naukowcy nie udowodnili ingerencji szczepionek genetycznych w genom ludzki jak również nie stwierdzono u człowieka żadnych zmian patologicznych powstałych w wyniku ich stosowania.

Badania nad szczepionkami z DNA zaczęły się niedawno. Naukowcy oceniają, jak działają one na układ odpornościowy – skuteczność szczepionek genowych w leczeniu i zapobieganiu chorobom jest dopiero badana. Badacze z jednej strony mają nadzieję, że wprowadzenie plazmidowego DNA do komórki będzie utrzymywać długotrwa-

łą i wysoką odpowiedź immunologiczną, z drugiej jednak strony obawiają się, czy nie doprowadzi to do autoagresji (ataku na własne komórki). Istnieje również obawa, iż plazmidowy DNA mógłby wbudować się do komórek gospodarza. W badaniach na zwierzętach nie stwierdzono jednak wystąpienia

efektów ubocznych. Udowodniono natomiast, że stosowanie szczepionek DNA jest wysoce skuteczne – wywołują one bowiem silną odpowiedź immunologiczną, chroniąc przed późniejszymi infekcjami: wzw typu B i C, AIDS, opryszczką, grypą, wścieklizną, malarią (ROGAN i BABIUK 2005).

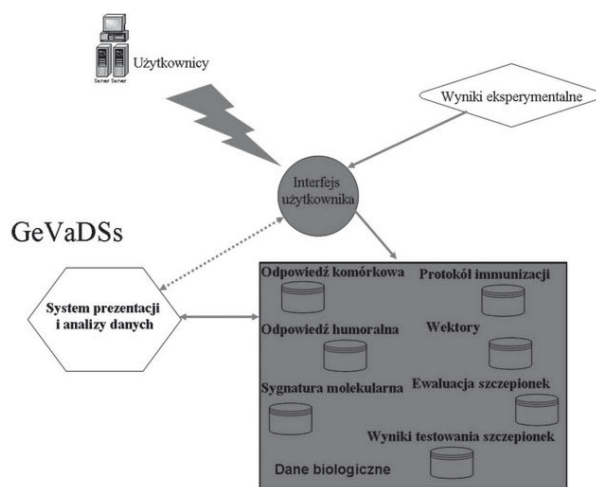
SYSTEM WSPOMAGANIA WYTWARZANIA SZCZEPIONEK

Wychodząc naprzeciw bieżącym potrzebom immunologii i wakcynologii, w ramach projektu CompuVac realizowanego w 6. Programie Ramowym Komisji Europejskiej, zespół Instytutu Informatyki Politechniki Poznańskiej podjął próbę usystematyzowania procesu wytwarzania szczepionek genetycznych poprzez stworzenie systemu wspomaganie ich wytwarzania – GeVaDSs (ang. Genetic Vaccine Decision Support system) (BŁĄŻEWICZ i współaut. 2006, 2008; ŁUKASIAK i współaut. 2007). Konsorcjum CompuVac, koordynowane przez Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie w Paryżu, skupia 18 instytucji naukowych i komercyjnych. Zespół Instytutu Informatyki Politechniki Poznańskiej jest jedynym laboratorium bioinformatycznym pracującym w ramach konsorcjum.

System GeVaDSs składa się z 7 modułów (Ryc. 1), z których każdy stanowi istotną część analizy odpowiedzi immunologicznej układu odpornościowego.

Fundamentem stworzenia tego systemu była idea, aby w jednym miejscu zgrupować wszystkie wyniki badań prowadzonych równolegle przez różne laboratoria, umożliwiając następnie ich analizę za pomocą zaawansowanych narzędzi statystycznych i wizualizacyjnych. Zrealizowanie tego zamiaru pozwoliło na stworzenie pełnego obrazu, jaką odpowiedź immunologiczną ma dany wektor, umożliwiając już na tym etapie pominięcie tych kierunków badań, czy też takich kombinacji wstrzyknięć antygenów, które nie rokują pozytywnych wyników. System ten może stać się bardzo istotnym punktem odniesienia również dla badań wykonywanych w przyszłości, gdyż pozwoli na porównanie odpowiedzi immunologicznej nowych wektorów z wektorami już wcześniej przeanalizowanymi. Pozwoli on również na jednoznaczne określenie, który z wektorów wywołuje odpowiedzi immunologiczne danego typu. Do opisu ekspery-

mentów immunologicznych wybrana została informacja o odpowiedzi komórkowej,



Ryc. 1 Schemat systemu GeVaDSs.

humoralnej oraz sygnaturze molekularnej rozumianej jako poziom ekspresji genów.

HIERARCHIA WEKTORÓW

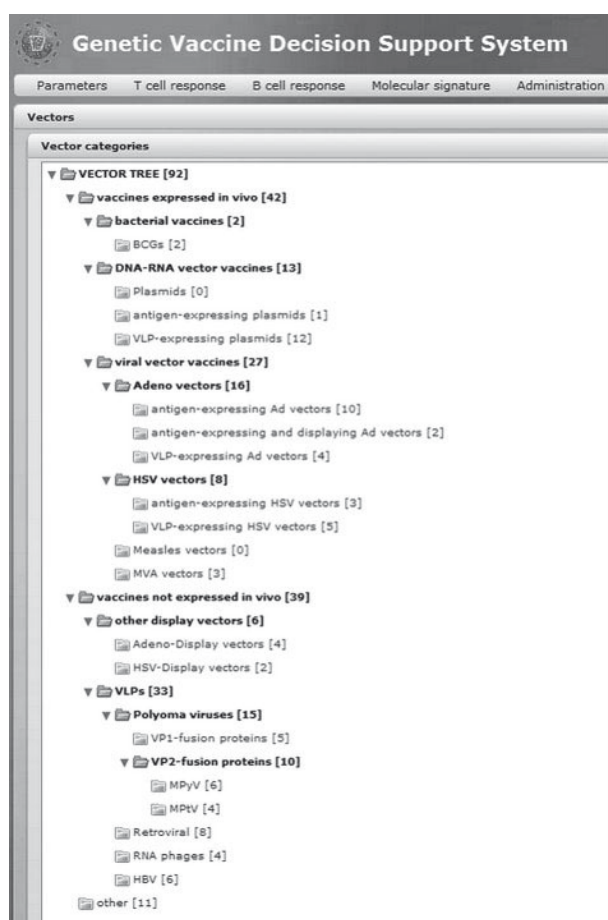
Głównym, a w zasadzie kluczowym elementem systemu było stworzenie hierarchii wektorów w oparciu o ich cechy biologiczne (Ryc. 2).

W wyniku tych działań powstała jednoznaczna hierarchia wektorów, dzięki której bardzo łatwo i szybko może zostać znaleziony poszukiwany wektor lub ich rodzina. Każdy z wektorów ma ustandaryzowany opis, zawierający szczegółową o nim informację, tj. producent, kategoria, sposób produkcji, informację o antygenie oraz jakiego typu odpowiedź immunologiczną wywołuje.

System pozwala na podgląd zarówno drzewa, jak i kategorii utworzonych wektorów (Ryc. 3).

PROTOKÓŁ IMMUNIZACJI

Kolejnym kluczowym elementem systemu była standaryzacja protokołu immunizacji zawierającego szczegółową procedurę

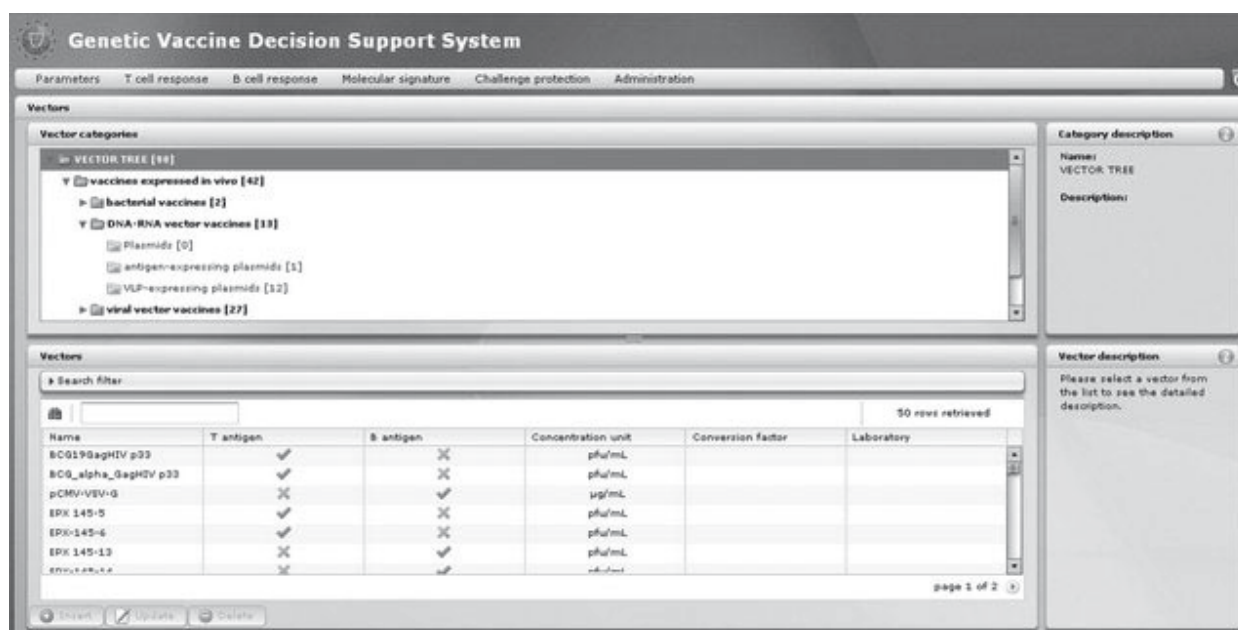


Ryc 2. Hierarchia wektorów.

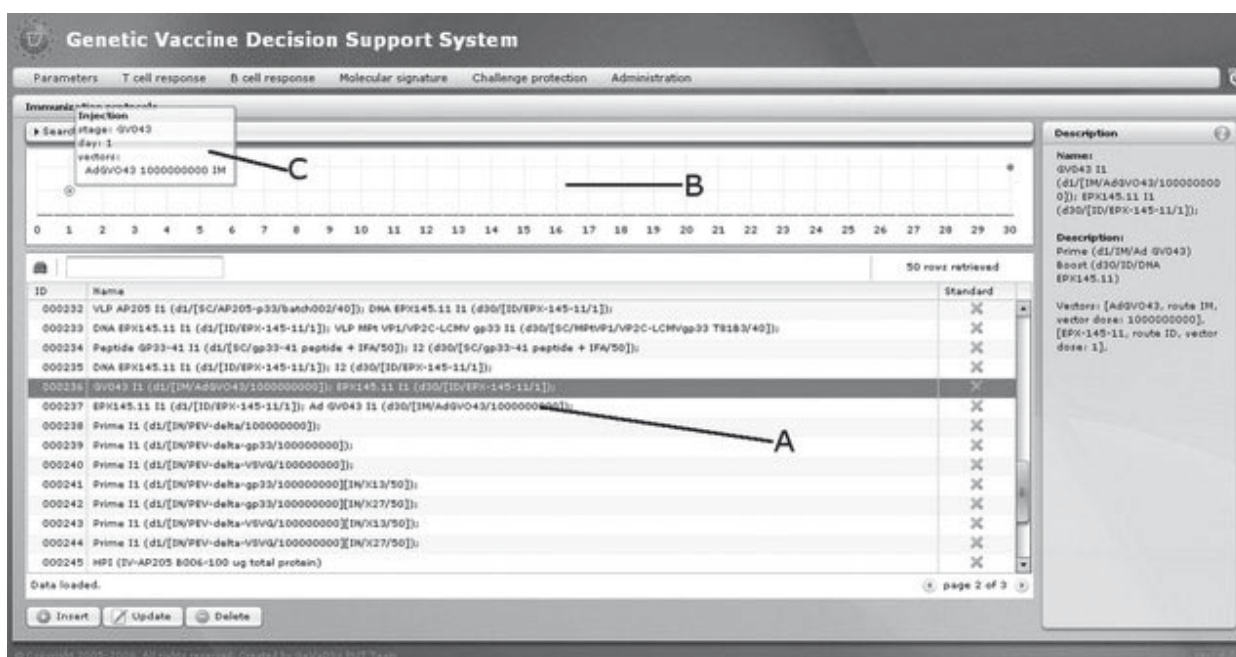
immunizacji użytą podczas eksperymentów. Informacje dotyczące protokołu immunizacji dotyczą liczby wstrzyknięć, dnia w którym dane wstrzyknięcie zostało wykonane, co jest szczególnie istotne przy immunizacji wieloetapowej, metody wprowadzenia szczepionki do organizmu, rodzaju wektora oraz dawki antygeny (Ryc. 4).

ANALIZA ODPORNOŚCI KOMÓRKOWEJ

Odporność komórkowa jest związana głównie z aktywnością limfocytów T, działających z udziałem limfocytów cytotoksycznych (ang. T cytotoxic lymphocyte, CTL) i pomocniczych limfocytów T CD4+. Komórki CTL rozpoznają antygeny wirusowe obecne na powierzchni komórek w kompleksie z wybranymi białkami, co prowadzi do eliminacji zainfekowanych komórek zanim dojdzie w nich do namnożenia się i uwolnienia cząstek wirusowych. Mechanizm rozpoznania takich komórek zależy od tego, czy antygeny wirusowe staną się zdolne do wytworzenia kompleksu ze składnikami białek i przeniesieniu go do błony komórkowej. Limfocyty pomocnicze T CD4+ stanowią również ważny element systemu obronnego wpływając na tworzenie systemu zapalnego w odpowiedzi na infekcję wirusową. Limfocyty pomocnicze T stymulują następnie proliferację komórek B dostarczających immunoglobulin związanych z odpowiedzią humoralną. Zdolność do wywołania takiej odpowiedzi zależy od rodzaju



Ryc. 3. Podgląd listy wektorów.



Ryc. 4. Lista protokołów immunizacji (A) wraz z ich graficzną reprezentacją (B) oraz szczegółową informacją o danym wstrzyknięciu (B).

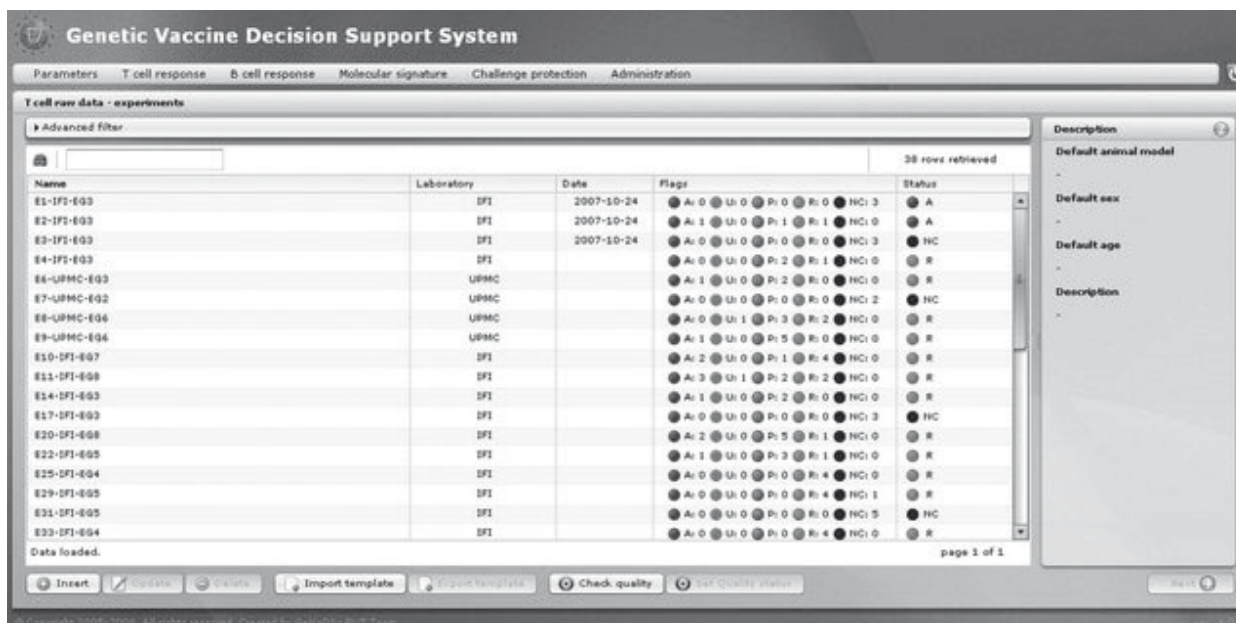
wirusa, jego poszczególnych składników antygenowych i stanu gospodarza (PIEKAROWICZ 2004).

W opisywanym systemie odpowiedź komórkowa jest scharakteryzowana poprzez następujące parametry:

- poziom interferonu gamma (IFN- γ),
- dzień pomiaru,

- szybkość namnażania (ang. clonal expansion),
- liczność komórek pamięci (ang. memory phenotype).

Wszystkie wyniki eksperymentów w systemie poddawane są weryfikacji pod kątem ich jakości zarówno ze strony biologicznej, jak i matematycznej (Ryc. 5). W systemie zaimplementowanych zostało kilka tysięcy reguł, któ-



Ryc. 5. Lista eksperymentów wraz z informacją o ich stanie.

Rule	Class	Description
009	DESIGN	The number of the N/NC groups in experiment is too low. [Value: 0; Expected value ranges <1;1>]. Experimental group: eg1
016	DESIGN	The number of individuals is incorrect. [Value: 0; Expected value ranges <5;INF>].
017	DESIGN	The number of individuals with status 1 is incorrect. [Value: 0; Expected value ranges <5;INF>].
018	DESCRIPTIVE	The missing results are: CFSElo, CFSEhi, IFNg [Value: 0; Expected value ranges <3;3>]. Experimental group: eg2
016	DESIGN	The number of individuals is incorrect. [Value: 0; Expected value ranges <5;INF>].
017	DESIGN	The number of individuals with status 1 is incorrect. [Value: 0; Expected value ranges <5;INF>].
018	DESCRIPTIVE	The missing results are: CFSElo, CFSEhi, IFNg [Value: 0; Expected value ranges <3;3>].

Ryc. 6. Informacja o błędach/brakach.

re muszą być spełnione, aby wyniki eksperymentu mogły zostać uznane za wiarygodne i dokonane z należytą starannością. System po zweryfikowaniu danego eksperymentu generuje zwrotną informację o błędach/brakach, które muszą zostać uzupełnione przez eksperymentatora (Ryc. 6).

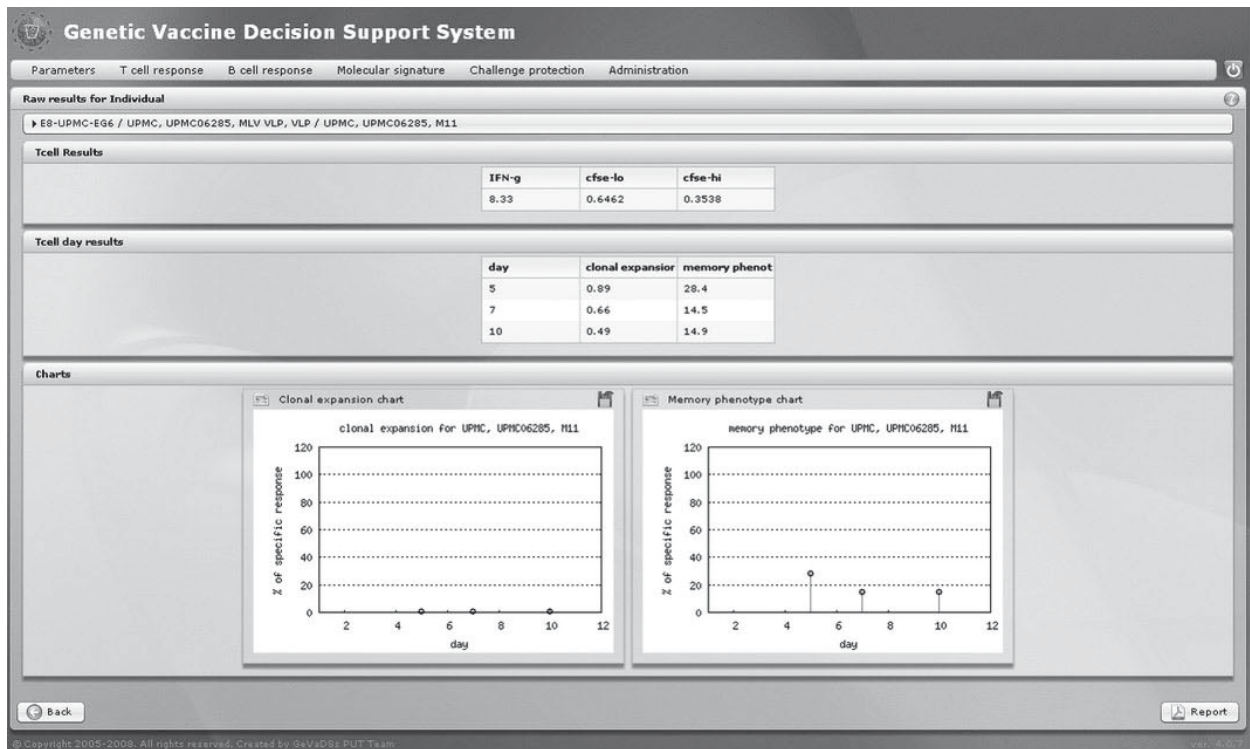
Eksperyment musi zostać zdefiniowany w systemie poprzez podanie odpowiednich informacji o autorze, jak również poprzez wybór protokołu immunizacji wraz ze szcze-

gólami dotyczącymi liczby osobników poddawanych testom. Po wprowadzeniu wspomnianych danych system jest w stanie wygenerować arkusz kalkulacyjny przystosowany dokładnie do parametrów zdefiniowanego eksperymentu, który systematyzuje wyniki badań (Ryc. 7).

System umożliwi analizę wyników zarówno na najniższym poziomie szczegółowości (wyników poszczególnych atrybutów dla każdego osobnika) (Ryc. 8), jak i

Group #	Type	Indiv. name	%Tcr	%Mem	%Tcr	%Mem	%Tcr	%Mem	%CFSE-hi	%CFSE-lo	%IFN-g	Status
experimental group 1	Experimental Vaccine	M1										1
		M2										1
experimental group 2	Internal Standard	M1										1
		M2										1
		M3										1

Ryc. 7. Przykład arkusza kalkulacyjnego przygotowanego do wypełnienia (A-H - pola odpowiednich atrybutów).



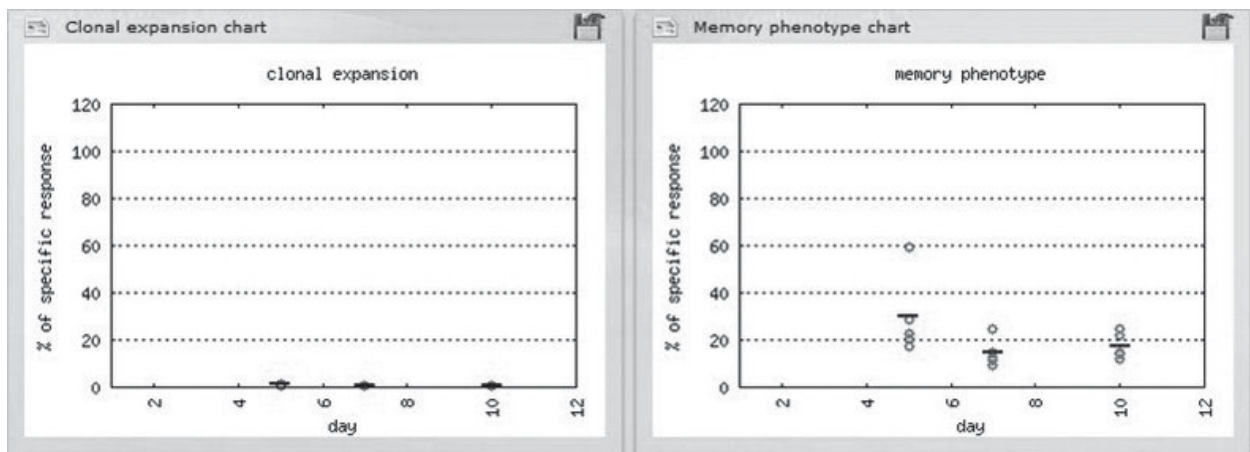
Ryc. 8. Wyniki dla wybranego osobnika.

na poziomie grup (Ryc. 9) oraz eksperymentów.

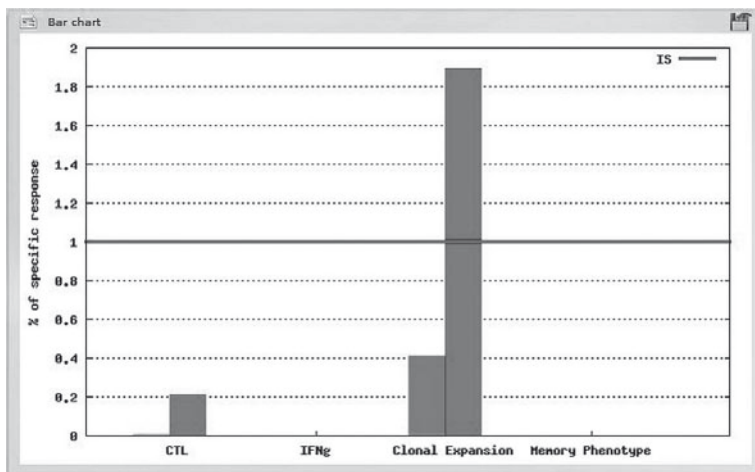
Podczas przeprowadzania eksperymentów immunologicznych sugeruje się, aby, wraz z normalnie planowanymi badaniami przeanalizować również odpowiedzi układu immunologicznego dla protokołu immunizacji, związanego z wcześniej ustalonym standardem (Ryc. 10).

Istnienie grupy, która umownie określana jest mianem standardu, stanowi istotny ele-

ment w przypadku próby porównania dwóch niezależnych eksperymentów. Porównanie takie może mieć miejsce jedynie w przypadku, gdy dla obu grup zdefiniowana została grupa reprezentująca ten sam standard (grupa zawierająca ten sam protokół immunizacji). W efekcie dokonywane jest względne porównanie wyników eksperymentalnych pomiędzy wybranymi grupami różnych eksperymentów. Takie rozwiązanie pozwala z jednej strony zminimalizować wpływ czynników



Ryc. 9. Wyniki dla grupy.



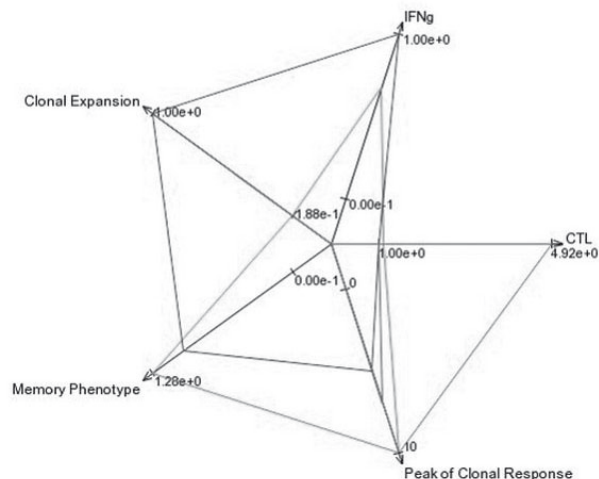
Ryc. 10. Wyniki dla eksperymentu względem określonego standardu.

zewnątrznych na przebieg eksperymentu, a z drugiej, porównać wyniki pochodzące z różnych laboratoriów, wykonane w różnym czasie (Ryc. 11).

Wszystkie wyniki przeprowadzonych analiz mogą zostać wygenerowane w postaci raportu, którego kształt i zawartość jest w pełni definiowalna przez użytkownika (Ryc. 12).

ANALIZA ODPOWIEDZI HUMORALNEJ

Odpowiedź humoralna jest głównym składnikiem strategii obronnej gospodarza i zależy od zdolności komórek B – wytwarzających powierzchniowe immunoglobuliny – do rozpoznania specyficznego epitopu (fragmentu) w obcym antygenie. Rozpoznanie takie prowadzi do masowej proliferacji komórek B poprzez działanie limfocytów pomocniczych T i uwolnienie do krwi różnych klas specyficznych przeciwciał łączących się bezpośrednio z antygenami. Jeśli do takiej odpowiedzi dojdzie we wczesnej



Ryc. 11. Porównanie grup z różnych eksperymentów.

fazie infekcji, organizm jest zdolny do szybkiego i efektywnego pozbycia się wirusa. W zależności od typu wirusa przeciwciała będą

Report type: Standard report Full report Custom report

Descriptions:

- Experiment information (detailed) Experiment information (summary)
- Experimental group information (detailed) Experimental group information (summary)
- Individual information

Report sections:

- Group results (chart) Group Results (data table)
- Individuals day results (data table) General individuals results
- Individuals day results (charts)

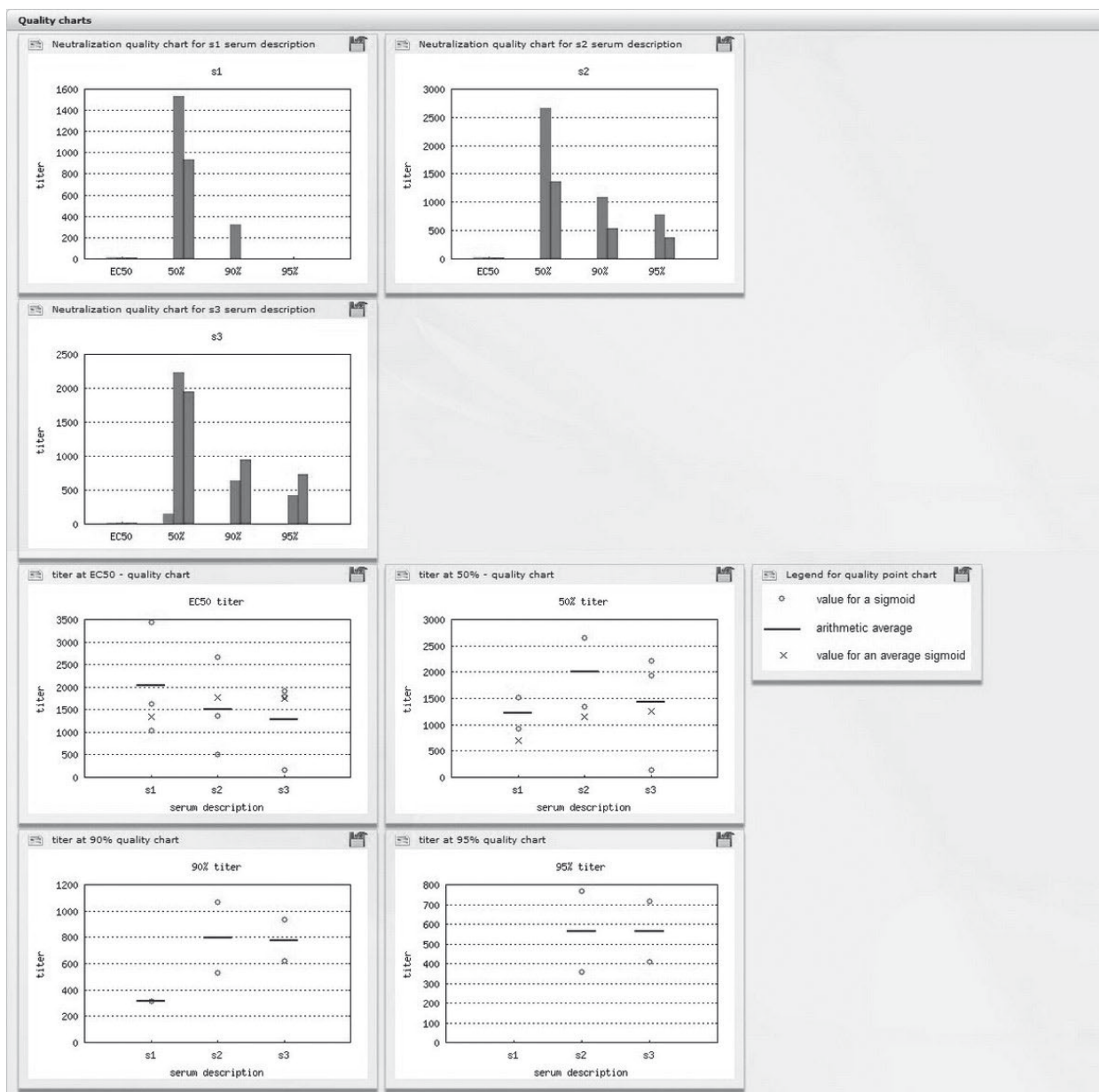
Summary:

- Report comments

Report comments:

Generate

Ryc. 12. Okno raportu.



Ryc. 13. Przykład prezentacji wyników odpowiedzi humoralnej dla grupy (neutralization assay).

skierowane przeciwko epitopom znajdującym się w różnych składnikach morfologicznych cząstek wirusowych (PIEKAROWICZ 2004).

Moduł odpowiedzi humoralnej jest wyposażony we wszystkie funkcjonalności znajdujące się w module odporności komórkowej (weryfikacja jakości eksperymentu, generacja szablonów, raporty, statystyki) (Ryc. 13, 14).

SYGNATURA MOLEKULARNA

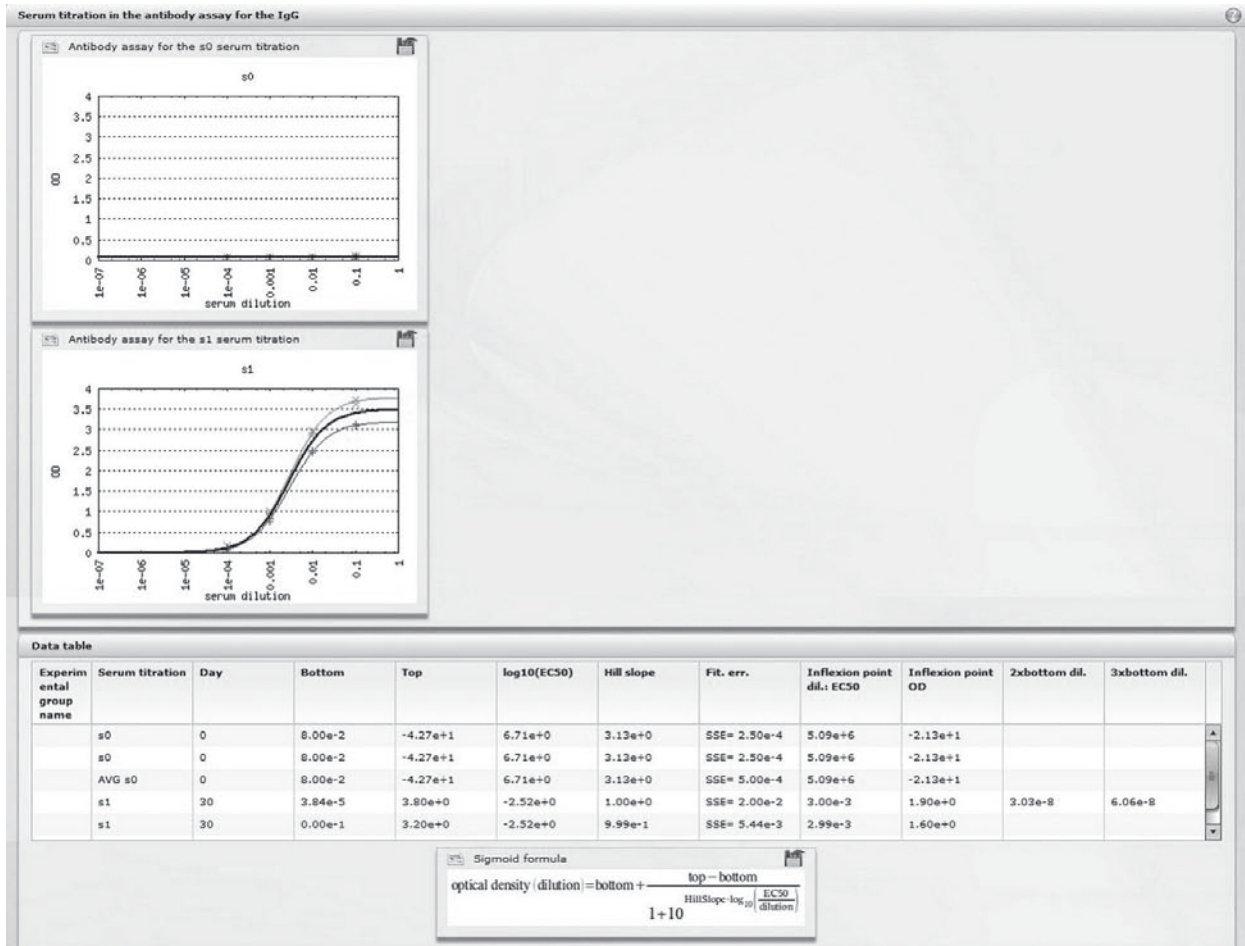
Sygnatura molekularna reprezentuje poziom ekspresji poszczególnych genów w

wyniku immunizacji i jej celem jest wyeksplorowanie podzbioru genów najbardziej czułych na pojawienie się danego zakażenia. Celem tych badań jest stworzenie grupy markerów, których obserwacja będzie wystarczająca do stwierdzenia danej infekcji. Zaprojektowany system umożliwi wprowadzenie i analizę wyników badań mikromacierzy pochodzących od różnych producentów. Również ten moduł wyposażony jest w podobne funkcjonalności jak dwa poprzednie. Dodatkowo istnieje możliwość porównywania między sobą przeprowadzonych ekspe-

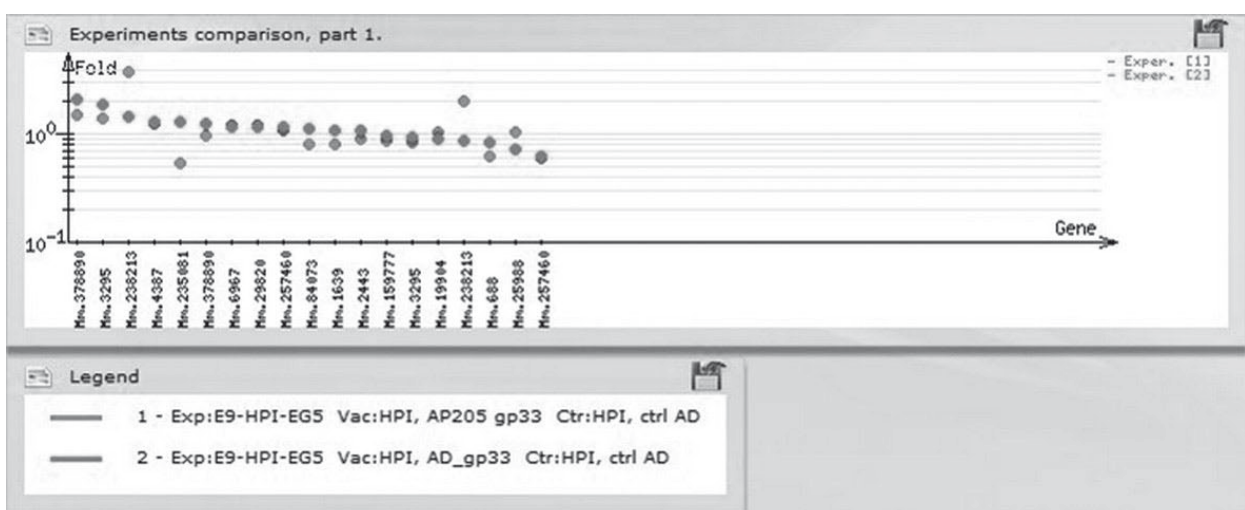
rymentów, wprowadzania indywidualnych filtrów zawierających podzbiory genów, jak i wprowadzania filtrów biologicznych i statystycznych (Ryc. 15).

ANALIZA EKSPERYMENTÓW IMMUNIZACJI

Moduł analizy eksperymentów immunizacji jest związany ze zweryfikowaniem badań



Ryc. 14. Przykład prezentacji wyników odpowiedzi humoralnej dla grupy (antibody assay).



Ryc. 15. Przykład porównania ekspresji tego samego podzbiory genów dla dwóch różnych eksperymentów.

przeprowadzonych na potrzeby trzech poprzednich modułów. Po pozytywnej weryfikacji danego protokołu immunizacji następuje faza testów umożliwiająca określenie skuteczności danej szczepionki. Moduł ten zawiera szczegółowe informacje o długości życia zaszczepionych osobników, których następnie zarażono wirusem, przeciwko któremu miała chronić dana szczepionka.

EWALUACJA JAKOŚCI SZCZEPIONEK

Wszystkie szczepionki, a w szczególności wektory użyte do stworzenia szczepionek, podlegają w tym module ocenie pod kątem skuteczności działania i przydatności do produkcji nowych szczepionek genetycznych. Każdy z wektorów jest oceniany w oparciu o wyniki eksperymentalne uzyskane dla odpowiedzi komórkowej, humoralnej oraz sygnatury molekularnej.

PODSUMOWANIE

Szczepionki genetyczne umożliwiają pokonanie kolejnej bariery w medycynie, pozwalając zarówno na leczenie schorzeń nowotworowych, jak i wad wrodzonych. Rekombinacja wektorów wirusów i wirusopodobnych organizmów jest najbardziej obiecującą techniką pozwalającą na dostarczanie antyciał w profilaktycznych i terapeutycznych szczepionkach, w celu zapobiegania i zwalczania różnorodnych infekcji czy też komórek rakotwórczych. Niestety obecnie koszt ich wywarzania jest dosyć wysoki ze względu na brak jednolitych standardów przy ich wytwarzaniu.

Aktualnie wszelkie dane eksperymentalne, pochodzące z dziedziny immunologii, są przechowywane i analizowane w nieusystematyzowany sposób, bez możliwości efektywnego i wiarygodnego porównywania otrzymywanych wyników. Stworzenie informatycznej platformy w postaci portalu, do którego dostęp będą mieli wszyscy eksperci z tych dziedzin, oraz która będzie grupowała narzędzia i

protokoły umożliwiające standaryzację otrzymanych wyników stanowi ogromny przełom w badaniach nad szczepionkami nowych generacji. Opisany system GeVaDS umożliwi wykorzystanie różnorodnych narzędzi analitycznych i statystycznych, pozwalających na zapoznanie się z jakością i skutecznością odpowiednich wektorów i antygenów, jak również narzędzi wspierających projektowanie nowych szczepionek. Pozwala on przede wszystkim na uproszczenie przeprowadzania eksperymentów, stanowiąc miejsce referencyjne dla badań związanych z odpornością układu immunologicznego. Opierając się na ostatnich danych z konsorcjum CompuVac, system GeVaDS umożliwił opracowanie potencjalnej szczepionki na HCV (wirusa wirusowego zapalenia wątroby typu C).

Podziękowanie. Niniejszym chcielibyśmy podziękować dr. Marcinowi Grynbergowi i dr. Krzysztofowi Pawłowskiemu za udzieloną pomoc i cenne wskazówki.

GENETIC VACCINE DECISION SUPPORT SYSTEM

Summary

Genetic vaccines and especially recombinant viral vectors and virus-like particles are considered the most promising vehicles for delivery of antigens in prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases and cancer. Several potential vaccine design systems exist but their cost-effective development cruelly lacks a standardized evaluation system. Solving the problem Genetic Vaccine Decision Support system (GeVaDSs, <http://www.compuvac.org>) has been implemented as a part of CompuVac project realized within 6th Framework Program of European Commission. Using GeVaDSs we have successfully developed and standardized methods for evaluation of the efficacy and safety of individual vaccine vectors, in a manner that allows comparison between different vaccine designs, tested in different laboratories, at different time points. With these methods, the efficacy of a unique set of vaccines has been analyzed

and compared with an intelligent database. GeVaDSs has allowed to make significant comparisons between different types of vaccines and to initiate novel vaccine design and vaccination regimens.

Besides monitoring of T- and B-cell immune responses, GeVaDSs is also aimed at monitoring vaccine "efficacy" and "safety" profiles by analyzing relevant molecular signatures obtained from transcriptomes studies. The "efficacy" and the "safety profile" have been validated, based on analyzing molecular signatures from whole liver and spleen after injection of vaccine vectors.

The results of these experiments will drive the development of HCV vaccines. The first HCV vectors generated in single immunization regimen were tested, and interesting results obtained suggest the great potential for the association of our two classes of vectors, viral and VLP derived.

LITERATURA

- BELAKOVA J., HORYNOVA M., KRUPKA M., WEIGL E., RASKA M., 2007. *DNA vaccines: are they still just a powerful tool for the future?* Arch. Immunol. Ther. Exp. 55, 387-398.
- BŁAŻEWICZ J., ŁUKASIAK P., WOJCIECHOWSKI P., KĘDZIORA P., BOROWSKI M., DZIURDZA B., 2006. *GeVaDSs – implementation and functionality*. Report No 30, Poznan University of Technology, Poznań
- BŁAŻEWICZ J., ŁUKASIAK P., WOJCIECHOWSKI P., KĘDZIORA P., BOROWSKI M., BŁAŻEWICZ M., 2008. *GeVaDSs – user manual 5.0*. Report No 38, Poznan University of Technology, Poznań.
- COSTA F., FRANCHIN G., PEREIRA-CHOCOLA V. L., RIBEIRO M., SCHEKMAN S., RODRIGUES M. M., 1998. *Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces Trypanosoma cruzi infection in mice*. Vaccine 16, 768-774.
- DANKO I., WOLFF J. A., 1994. *Direct gene transfer into muscle*. Vaccine 12, S1499-S1502.
- DREW D. R., LIGHTOWLERS M., STRUGNELL R. A., 2000. *Humoral immune responses to DNA vaccines-expressing secreted, membrane bound and non-secreted forms of the Taenia ovis 45W antigen*. Vaccine 18, 2522-2532.
- ERTL H. C. J., XIANG Z., 1996. *Novel vaccine approaches*. J. Immunol. 156, 3579-3582.
- HOFFMAN S. L., DOOLAN D. L., SEDEGAH M., AGUIAR J. C., WANG R., MALIK A., GRAMZINSKI R. A., WEISS W. R., HOBART P., NORMAN J. A., MARGALITH M., HEDSTROM R. C., 1997. *Strategy for development of a pre-erythrocytic Plasmodium falciparum DNA vaccine for human use*. Vaccine 15, 842-845.
- JAKÓBISIAK M., 2002. *Immunologia*. Wydanie Naukowe PWN, Warszawa.
- KOFTA W., WĘDRYCHOWICZ H., 2001. *c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages*. Vet. Parasitol. 94, 243-247.
- ŁUKASIAK P., BŁAŻEWICZ J., KLATZMANN., 2007. *GeVaDSs – system for new improved vaccines based on genomic and proteomic information*. ICOLE'08 – German-Polish Workshop on Computational Biology, Perspectives of Bioinformatics, Operations Research and Machine Learning, June, 2008, Lessach, Austria.
- PEACHMAN K. K., RAO M., ALVING C. R., 2003. *Immunization with DNA through the skin*. Methods 31, 232-242.
- PIEKAROWICZ A., 2004. *Podstawy wirusologii molekularnej*. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa.
- REYES-SANDOVAL A., ERTL H. C., 2001. *DNA vaccines*. Curr. Mol. Med. 1, 217-43.
- MANOJ S., BABIUK L. A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., 2004. *Approaches to enhance the efficacy of DNA vaccines*. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 41, 1-3.
- ROGAN D., BABIUK L. A., 2005. *Novel vaccines from biotechnology*. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 24, 159-174.
- SCHNEIDER R. J., MOHR I. 2003. *Translation initiation and viral tricks*. Trends. Bioch. Sci. 28, 130.
- SIEGRIST C. A., 1997. *Potential advantages and risks of nucleic acid vaccines for infant immunization*. Vaccine 15, 798-800.