

Генная инженерия

Лекция10. Генная инженерия человека (бакалавры)

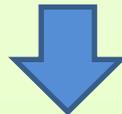
Составитель: проф. М.Р. ШАРИПОВА

Генная инженерия человека

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА



ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВСЕХ ГЕНОВ



- **ГЕНОТЕРАПИЯ**
- **ГЕНОДИАГНОСТИКА**
- **РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА**
- **КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ**
- **ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ**

- Генная терапия – коррекция заболевания путем введения в клетку-мишень генетических конструкций с целью лечебного воздействия
- Генетические манипуляции с клетками человека нацелены на получение экспрессии гена, приближенной к нормальным физиологическим значениям
- Генная терапия корректирует соматические, а не зародышевые клетки, чтобы избежать передачу генетически модифицированной ДНК следующим поколениям

Генетическая безопасность

- **Биобезопасность — одна из приоритетных задач человечества**
- **Методы генной терапии направлены на генетический аппарат человека и поднимают проблему о допустимости такого вмешательства**
- **Оценка генетического риска, на основании которой можно решать вопрос о проведении такой процедуры**
- **Все препараты для генной терапии должны проходить доклинические испытания на ЖИВОТНЫХ**

Подходы в генной терапии

По типу клеток-мишеней:

1. Соматическая
2. Фетальная

По цели воздействия:

1. Позитивная – восстановление (компенсация) экспрессии гена
2. Негативная - подавление функции гена

По тактике введения генотерапевтического агента:

1. ex vivo
2. in vivo

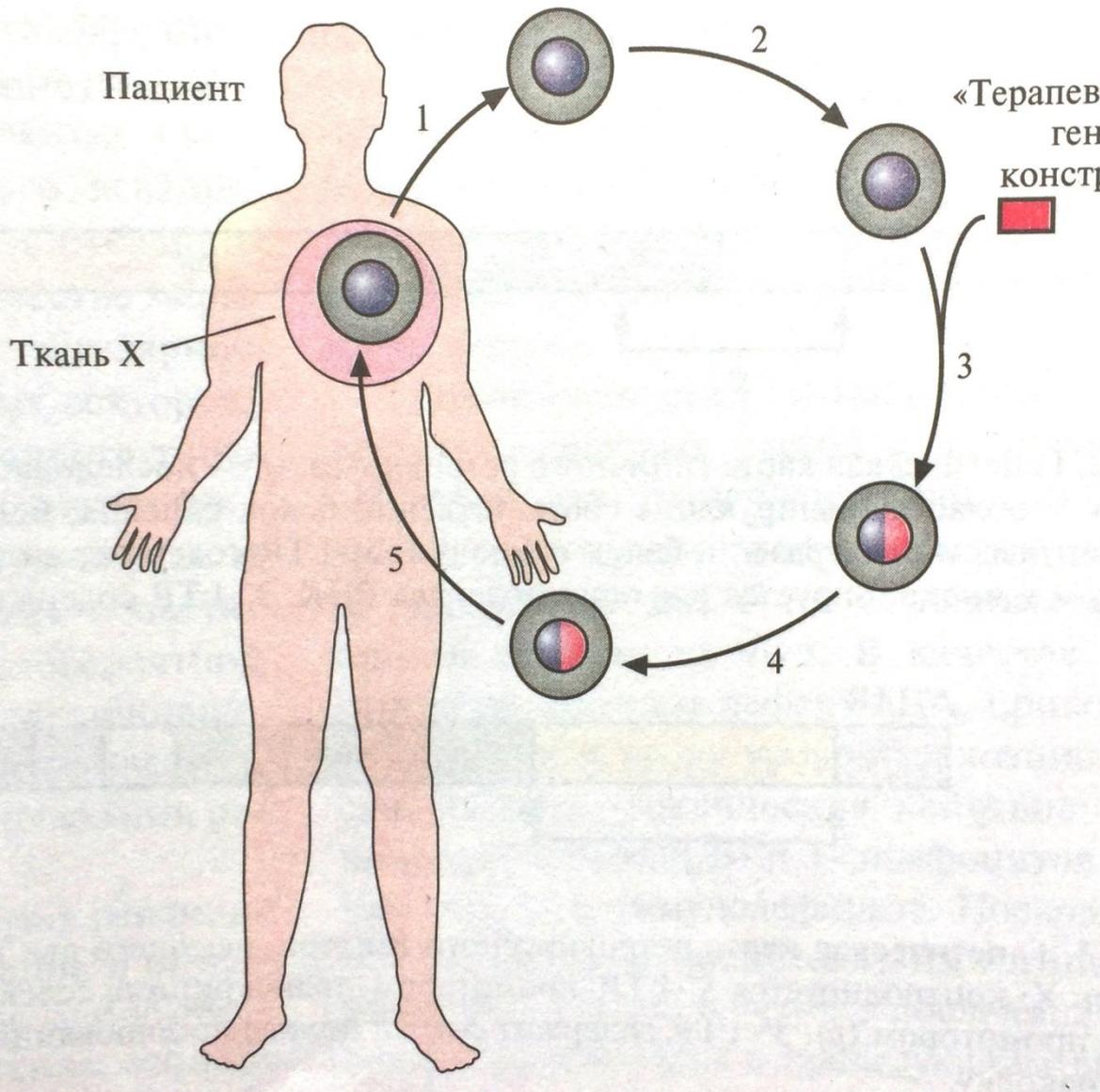
Генная терапия ex vivo

- Основные условия :

1. Отсутствие отторжения терапевтической конструкции
2. Эффективный перенос конструкции
3. Стабильная экспрессия терапевтического гена (ТГ)

- Использование собственных клеток пациента – аутологичных клеток – гарантирует, что после инфузии не разовьется иммунный ответ

Генная терапия ex vivo



- Процедура включает:**
- 1) Получение от пациента клеток с генным дефектом**
 - 2) Культивирование изолированных клеток**
 - 3) Трансфекцию терапевтической конструкции в изолированные клетки**
 - 4) Отбор, выращивание и тестирование трансфицированных клеток**
 - 5) Инфузия трансфицированных клеток пациенту**

Генная терапия *ex vivo*

- Генную терапию ***ex vivo*** используют для лечения заболеваний, связанных с трансплантацией костного мозга – это основное направление
- Терапевтический эффект связан со стволовыми клетками костного мозга, которые могут дифференцироваться в различные типы клеток: В- и Т-лимфоциты, макрофаги, эритроциты, тромбоциты и остеокласты
- Например, если нарушена функция макрофагов, трансплантация костного мозга обеспечит реципиенту запас макрофагов из популяции модифицированных стволовых клеток

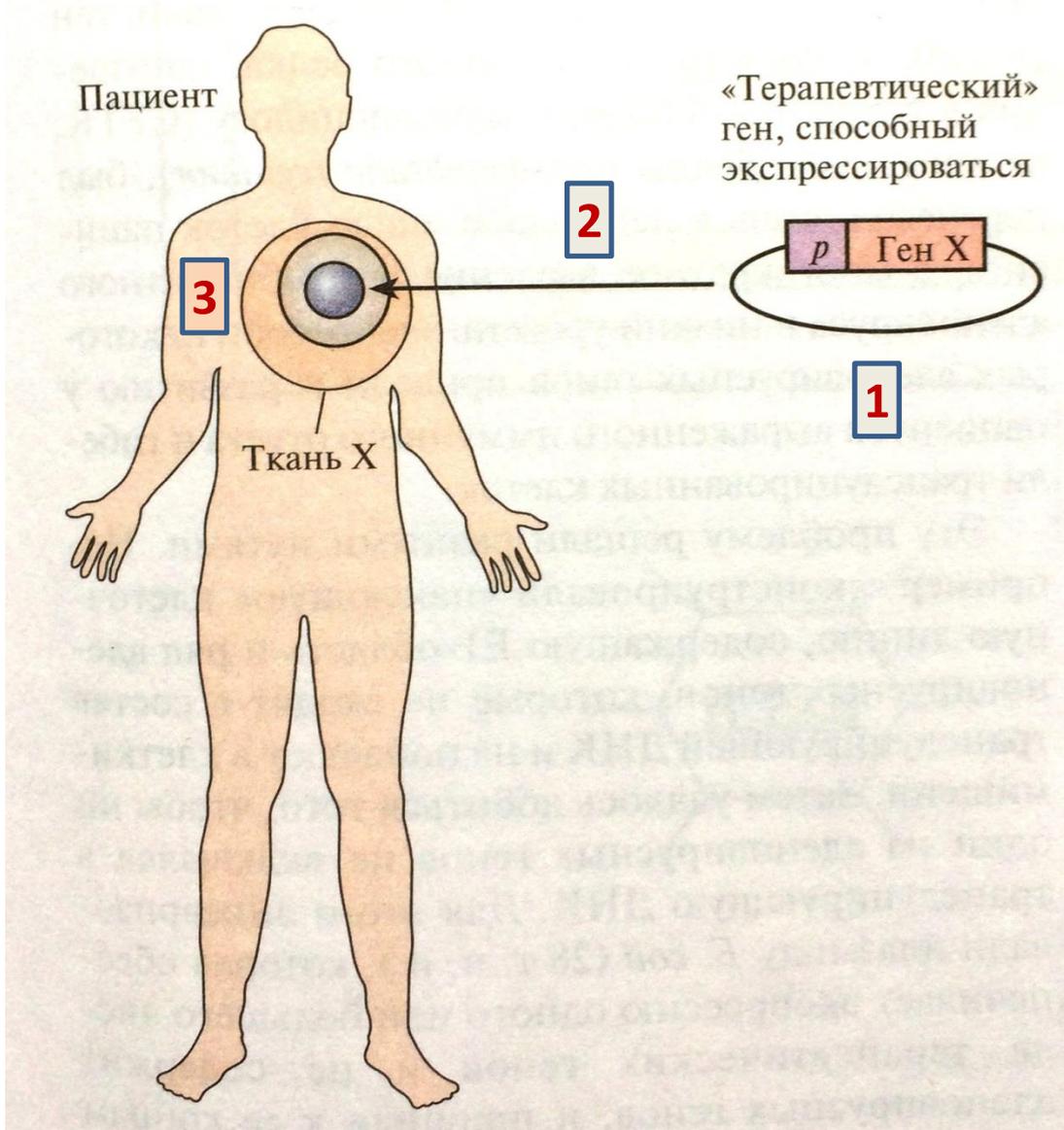
Генная терапия ex vivo

- Разрабатывают системы доставки на основе неаутологичных клеток
- Неаутологичная генная терапия ex vivo также включает выделение тканеспецифичных клеток и их генетическую модификацию с помощью терапевтического гена
- Рекомбинантные клетки заключают в искусственную мембрану, через которую рекомбинантный белок выходит в клетку. Мембрана неиммуногенна и не вызывает отторжения.
- Доклинические испытания на животных показали, что инкапсулированные рекомбинантные клетки могут пролиферируют и длительное время производить рекомбинантный белок

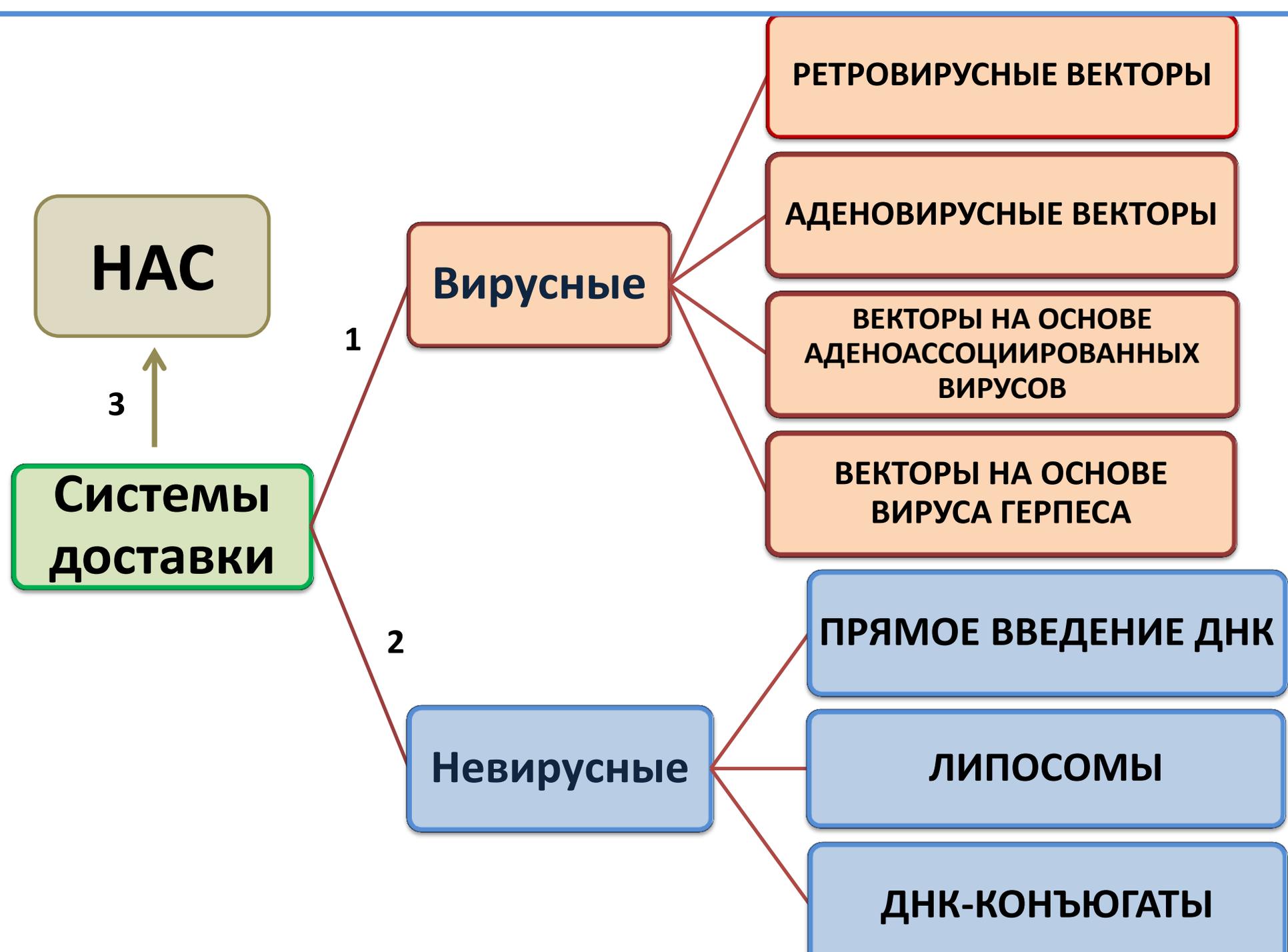
Генная терапия *in vivo*

- Генная терапия *in vivo* - это доставка терапевтического гена в клетки определенной ткани пациента
- Идеальная система доставки должна:
 - обеспечить высокую эффективность поглощения терапевтического гена
 - сохранность при транспортировке
 - поддержание экспрессии для облегчения состояния больного

Генная терапия *in vivo*



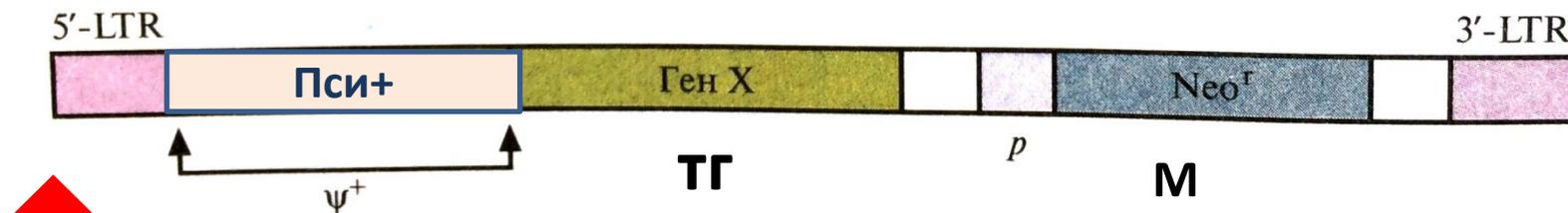
- 1.** Клонированный терапевтический ген (ГенX) кодирует белок, корректирующий генетический дефект.
- 2.** Ген доставляют к клеткам определенной ткани пациента, где он экспрессируется.
- 3.** Промотор *p*, под контролем которого осуществляется транскрипция, тканеспецифичен.



Векторы на основе ретровирусов



Геном ретровируса: 5'LTR – промоторы и сигнал инициации транскрипции
3'LTR – сигнал полиаденилирования



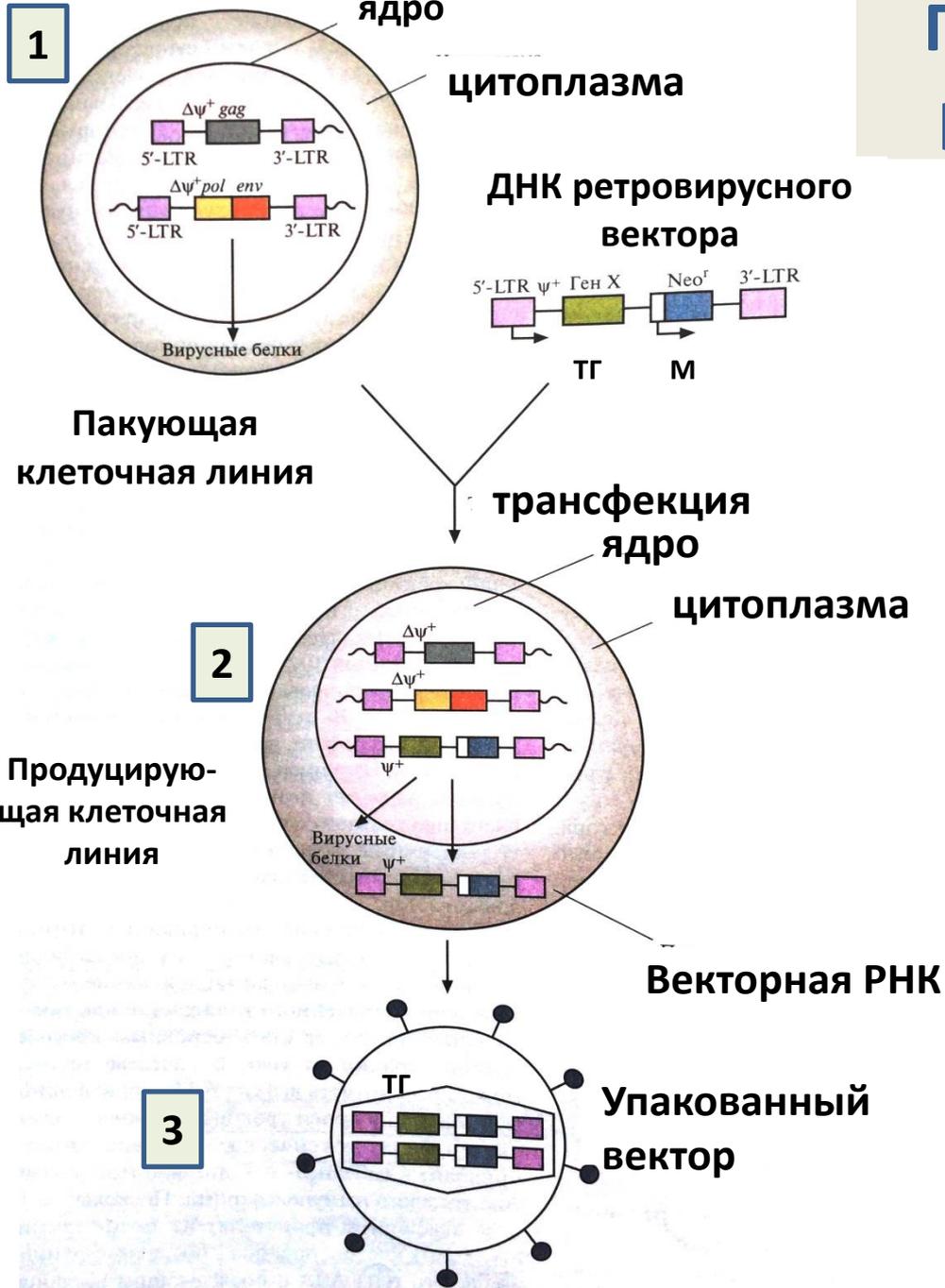
Геном ретровирусного вектора для переноса ТГ:

Ген X – терапевтический ген (ТГ)

Нео – маркерный ген для селекции

Емкость - 8 кб

Получение упакованного ретровирусного вектора



1) В хромосомах пакующей клеточной линии содержится вирусные гены: в одном участке— *gag*, в другом - *pol* и *env*, оба участка лишены последовательности для упаковки. Пакующая линия клеток синтезирует вирусные белки, но не упаковывает

2) После трансфекции пакующей линии клеток ретровирусным вектором, содержащим область для упаковки, РНК транскрибируются и упаковываются

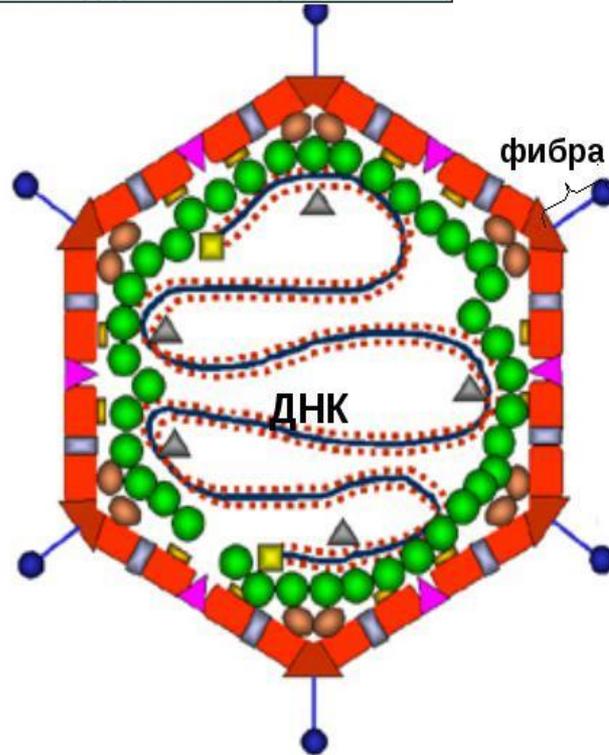
3) Высвобождающиеся вирусные частицы содержат ТГ и селективный маркер и не способны к репликации

АДЕНОВИРУСЫ

Структура аденовируса

Морфологические признаки:

- форма икосаэдра
- тип симметрии – кубический
- содержит ДНК
- вирион состоит из нуклеоида (ДНК+капсомеры)
- нет суперкапсида

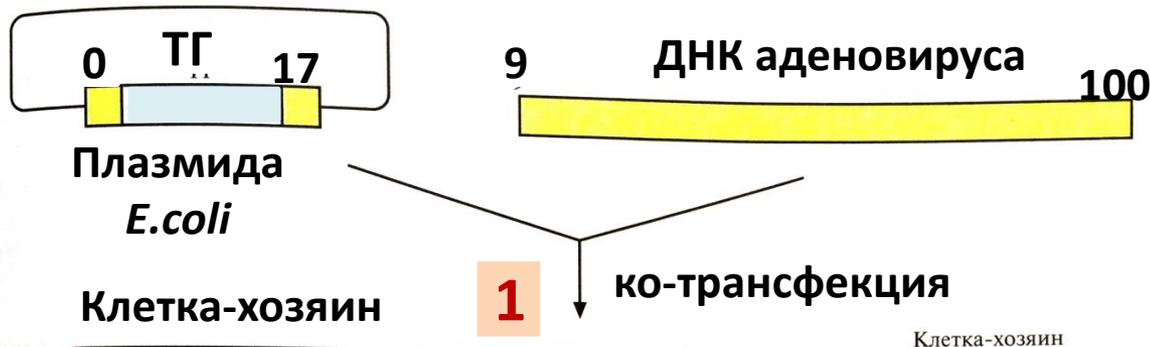


Аденовирусы - семейство ДНК-содержащих вирусов позвоночных

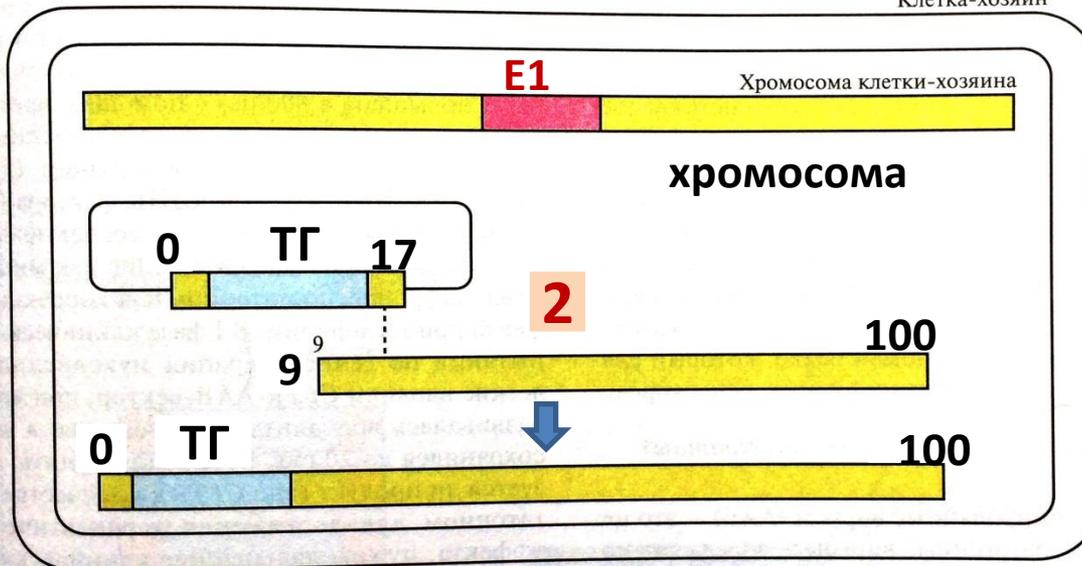
1. Аденовирусы содержат **дцДНК длиной 34 кб** в диаметре 70 нм
2. Вызывают острые респираторные заболевания, инфицируют неделящиеся клетки человека и используются в качестве живых вакцин от респираторных инфекций и гастроэнтеритов.

На основе аденовирусов разрабатывают векторы для доставки генов в неделящиеся клетки-мишени. Емкость 7,5 кб

Рекомбинантные аденовирусные векторы

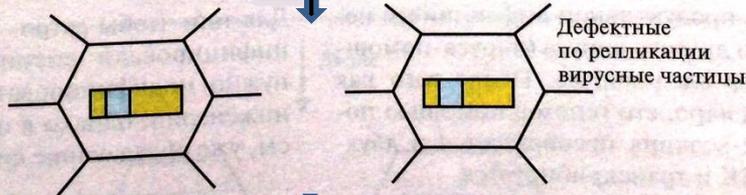


Клетка-хозяин



3 лизис клетки

Модифицированные вирусные векторы

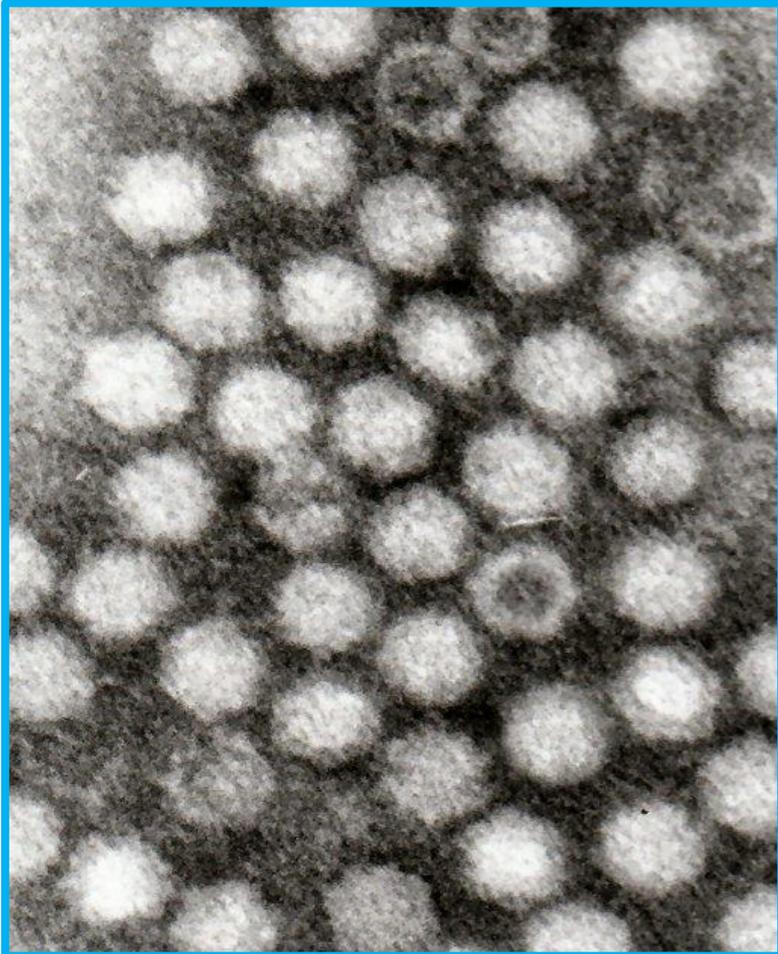


4 трансдукция

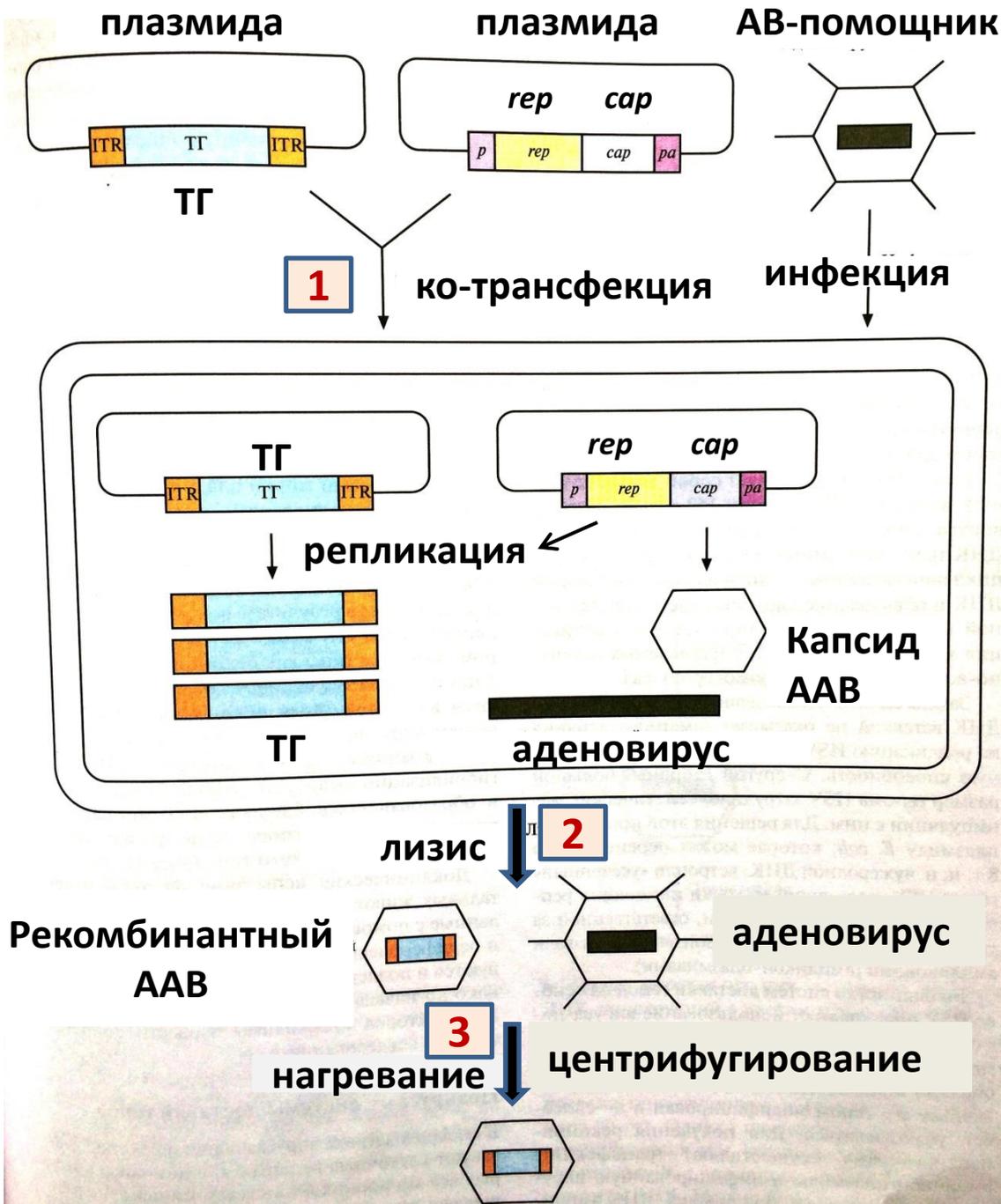
Клетка-мишень пациента

1. Котрансфекция клеточной линии, синтезирующей вирусный белок E1, плазмидным вектором и фрагментом ДНК аденовируса
2. Рекомбинация между перекрывающимися участками плазмиды и ДНК аденовируса
3. Рекомбинантная ДНК содержит ТГ, упаковывается и освобождается из клеток после лизиса
4. Рекомбинантный аденовирус инфицирует клетки-мишени, где экспрессируется ТГ

Адено- ассоциированные вирусы



- ААВ – это небольшие непатогенные вирусы человека с **оцДНК 4.7кб**, которая может интегрировать в 19 хромосому.
- Для продуктивной инфекции нуждаются в вирусе-помощнике (АВ)
- В клетке оцДНК достраивается до дцДНК и транскрибируется
- ААВ может инфицировать делящиеся и неделящиеся клетки
- **Отсутствие патогенности делает ААВ перспективным вектором для доставки ТГ**

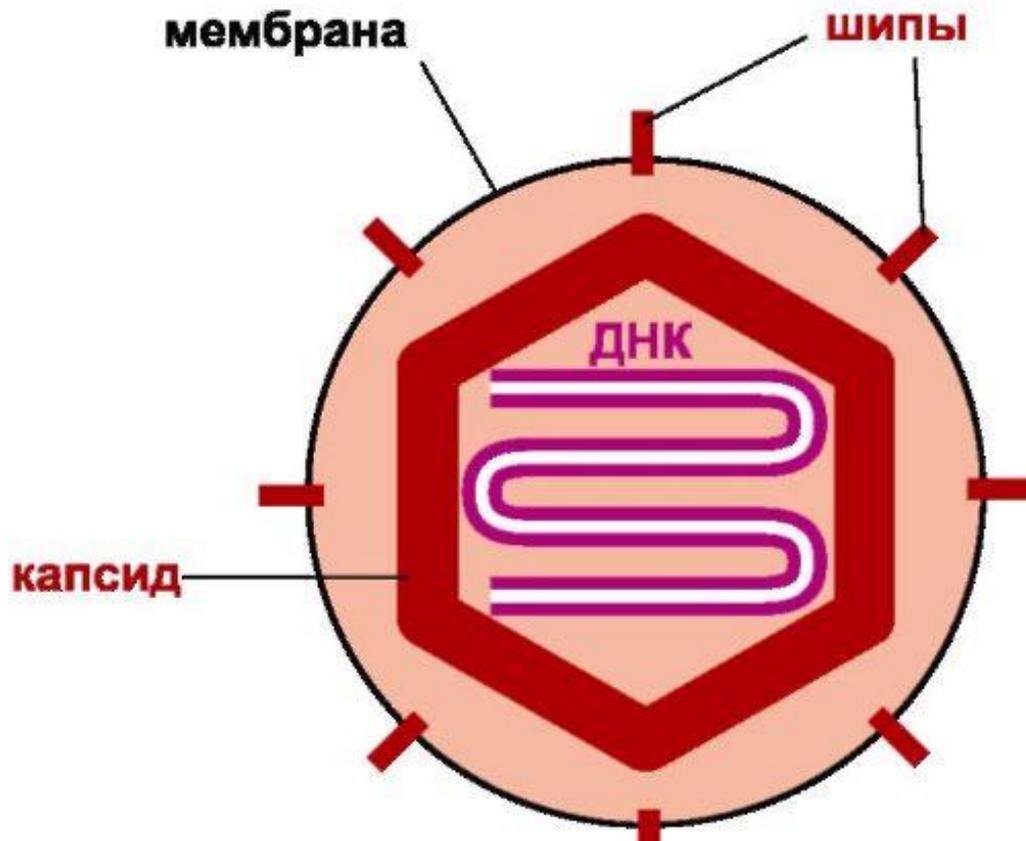


Рекомбинантный аденоассоциированный вектор

1. Котрансфекция клетки-хозяина с помощью АВ-помощника двумя плазмидами – одна несет ТГ, вторая – два гена ААВ для репликации ДНК и синтеза капсида
 2. После лизиса освобождаются рекомбинантные ААВ и аденовирусы
 3. Их разделяют нагреванием и центрифугированием
- Рекомбинантный ААВ несет вставку 4.5 кб**

Вирус герпеса

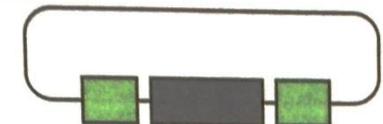
Herpes Simplex Virus-1, HSV-1



Существует множество заболеваний нервной системы и HSV является подходящим вектором для ГТ таких болезней

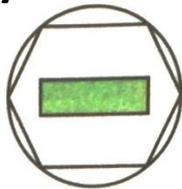
- Геном - это дцДНК длиной 152 кб, вирусная ДНК синтезируется по механизму катящегося кольца, инфицирует нейроны.
- Вирус состоит из нуклеокапсида и наружной мембраны, которую пронизывают гликопротеиновые шипы.
- Капсид вируса сливается с мембраной нейрона и его ДНК переходит в ядро.
- Большой геном **HSV** затрудняет манипуляции с ним.
- Емкость 30 кб

ампликон-плазмида



ori-HSV ТГ сигнал упаковки HSV

вирус-помощник



трансфекция

инфекция

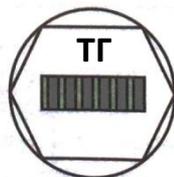
клетка-хозяин

Клетка-хозяин



Упаковка
Сборка
освобождение

HSV-вектор



трансдукция

Клетка-мишень

ВЕКТОР НА ОСНОВЕ ВИРУСА ГЕРПИСА (HSV)

- 1) В плазмиду *E. coli* встроены ТГ и фрагменты генома вируса: сайт начала репликации и последовательность, ответственная за упаковку
- 2) Трансфекцию плазмиды в клетку-хозяина проводили с помощью вируса-помощника HSV (геном изменен и не способен упаковываться)
- 3) В клетке ДНК ампликон-плазмиды реплицируется по типу катящего кольца
- 4) 10 ампликонов соответствуют полному геному HSV и упаковываются в капсид
- 5) HSV-вектор с ТГ используют для трансдукции нейронов

Вирусные векторы

- **Преимущество:** целенаправленно проникает в ядро клеток-мишеней
- **Недостатки:**
 - дорогостоящие
 - ограниченная емкость
 - вызывают воспалительную реакцию

Прямое введение ДНК

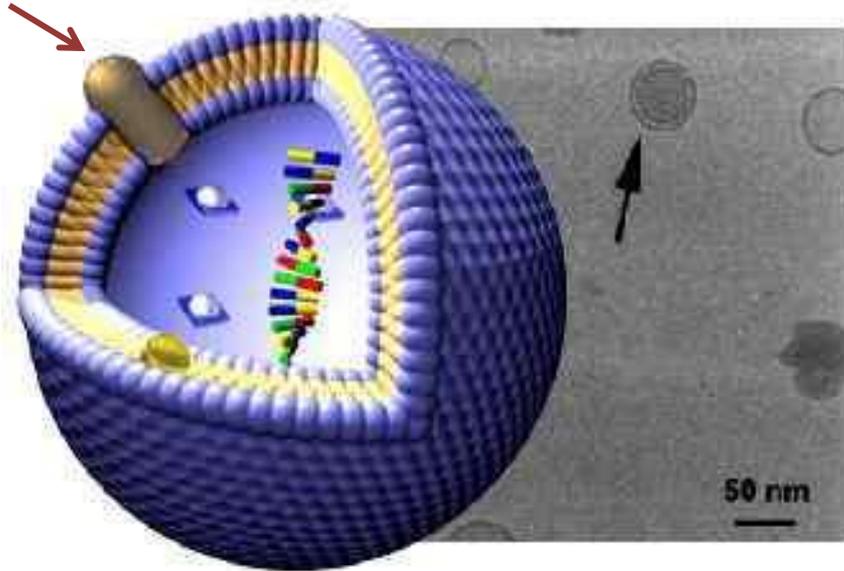
- ДНК-конструкцию вводят путем инъекции непосредственно в клетки ткани: ДНК проникает в ограниченное число клеток, на что указывает экспрессия гена-репортера в составе конструкции
- Применение этого подхода имеет ограничения:
 - 1) не все ткани доступны для инъекций
 - 2) требуется большое количество ДНК
- Для клеток кожи используют генную пушку: ДНК, конъюгированная на частицах золота попадает в клетки-мишени, в которых терапевтические гены экспрессируются и их продукты поступают в кровь

Липосомы

- Проникновение ДНК через мембрану можно облегчить, окружив генетическую конструкцию искусственной липидной оболочкой – липосома. Липокомплексы легко образуются и проникают внутрь клеток
- Преимущества: легко получить, нетоксичны, неиммуногенны
- Недостатки: низкая эффективность доставки, так как после попадания в клетку захватываются лизосомами и разрушаются

КАТИОННЫЕ ЛИПОСОМЫ И ПОЛИПЛЕКСЫ

лиганд



Созданы липосомы с самыми разными свойствами, например, катионные липосомы, полиплексы поверхность которых заряжена положительно. Они связываются с отрицательно заряженной ДНК и образуют ДНК-липидный комплекс.

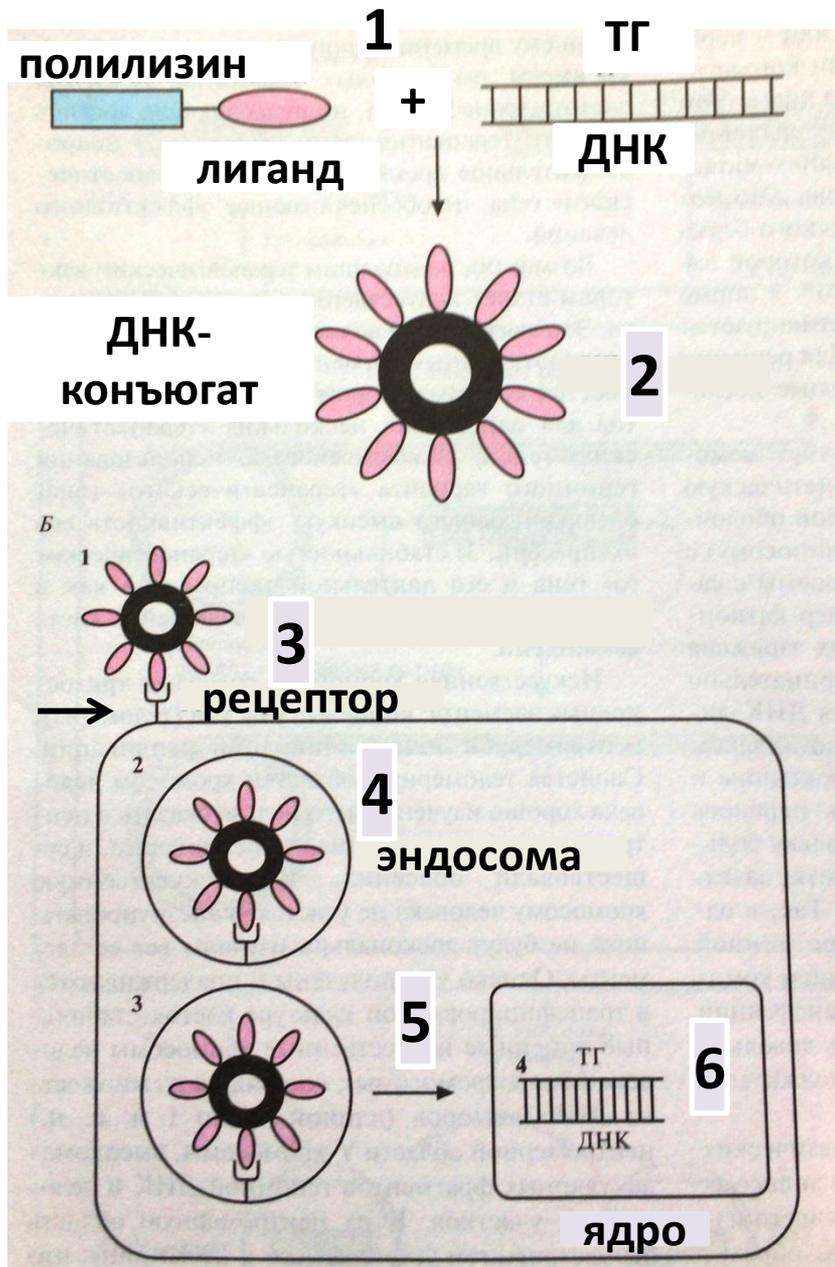
Преимущества

- Масштабирование, воспроизводство, стабильность, цена
- Неограниченный размер ДНК
- Низкая иммуногенность

Недостатки

- Низкая эффективность доставки

ДНК-конъюгаты



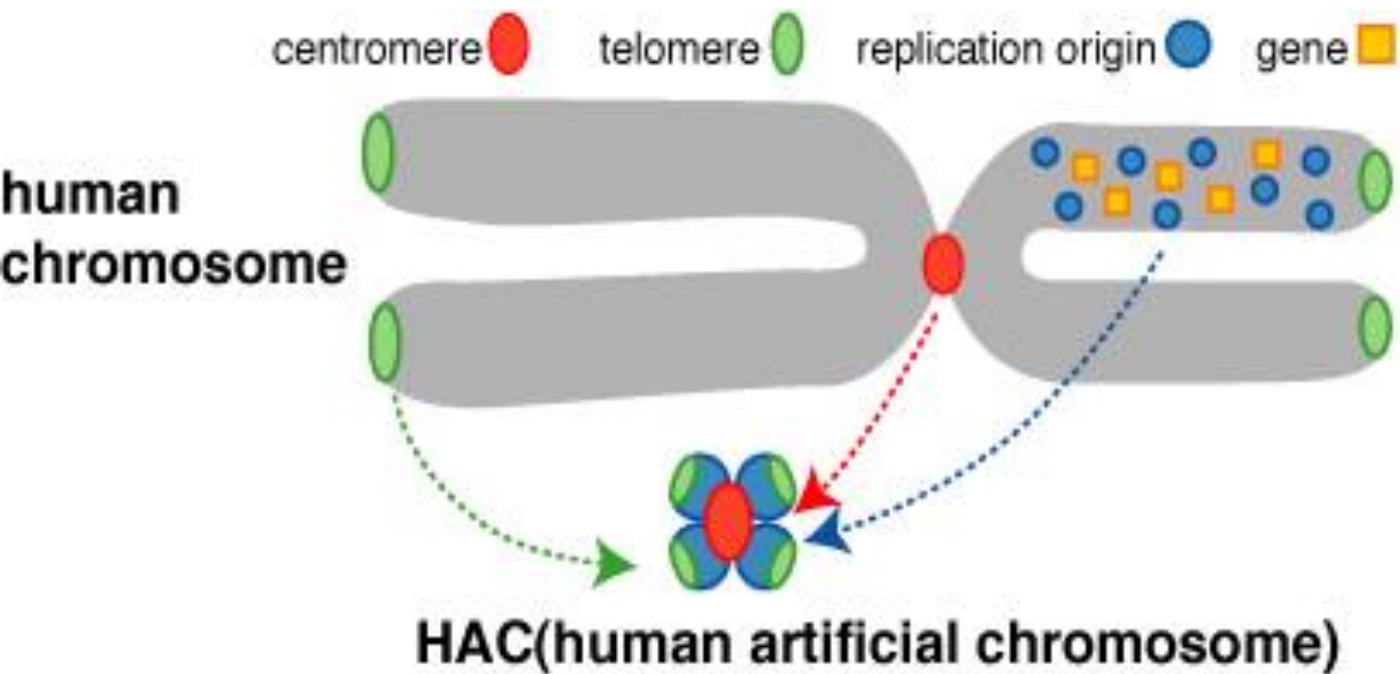
- ДОСТАВКА В КЛЕТКИ ДНК БОЛЬШЕ 10 кб ПУТЕМ ЭНДОСОМНОГО ТРАНСПОРТА ЧТОБЫ ИЗБЕЖАТЬ РАЗРУШЕНИЕ В ЛИЗОСОМАХ**
- 1.** Лиганд, специфичный к клеточным рецепторам, сшиваются с полилизинном и ТГ
 - 2.** Образуется ДНК-конъюгат, на поверхности которого сайты связывания с клеточным рецептором
 - 3.** ДНК-конъюгат после связывания обволакивается клеточной мембраной
 - 4.** Формируется эндосома, которая защищает его от лизосом
 - 5.** В эндосоме часть молекул освобождается из конъюгата и проникает в ядро клетки
 - 6.** В ядре происходит экспрессия терапевтического гена

- **Все невирусные системы доставки имеют два основных недостатка:**

1. низкая частота трансфекции, не позволяющая достичь нужного терапевтического эффекта

2. непродолжительное время экспрессии терапевтического гена, не обеспечивающее эффективного лечения

НАС-искусственная хромосома человека



Содержит три основных элемента: теломеры, центромеру и точки инициации репликации

Искусственные хромосомы являются альтернативной системой для доставки и экспрессии генов, чтобы решить все проблемы, возникающие при использовании других систем доставки генов

Преимущества искусственных хромосом

- **1.** Включение протяженных сегментов ДНК с полным набором регуляторных элементов для одного или нескольких терапевтических генов
- **2.** Возможность использования геномного варианта терапевтического гена для высокой эффективности его экспрессии
- **3.** Стабильность терапевтического гена и длительность его экспрессии
- **4.** Без риска иммунного отторжения из-за отсутствия вирусных ДНК

- **Искусственные хромосомы конструируют с применением двух подходов:**

1. «top-down», т.е. путем манипуляций, направленных на редукцию обычных хромосом
2. «bottom-up», т.е. путем de novo формирования центромеры и других функциональных участков

- **При помощи «top-down»** сконструированы ИХ из нативных хромосом X, Y, 14 и 21.
- Наиболее удачной считают 21-ИХ, у которой удалены почти все перицентромерные районы. Новая 21-ИХ, размером 5 м.п.о., не несёт в составе никаких кодирующих районов ДНК.
- **По технологии «bottom-up»** получены альфоид-tetO-ИХ, синтезированные de novo в нескольких клеточных линиях.
- Область центромеры альфоид-tetO-ИХ представлена чередованием альфа-сателлитов (повторы) и тетрациклиновым оператором (tetO).
- Их преимущество - центромера может быть инактивирована, можно контролировать экспрессию терапевтического гена

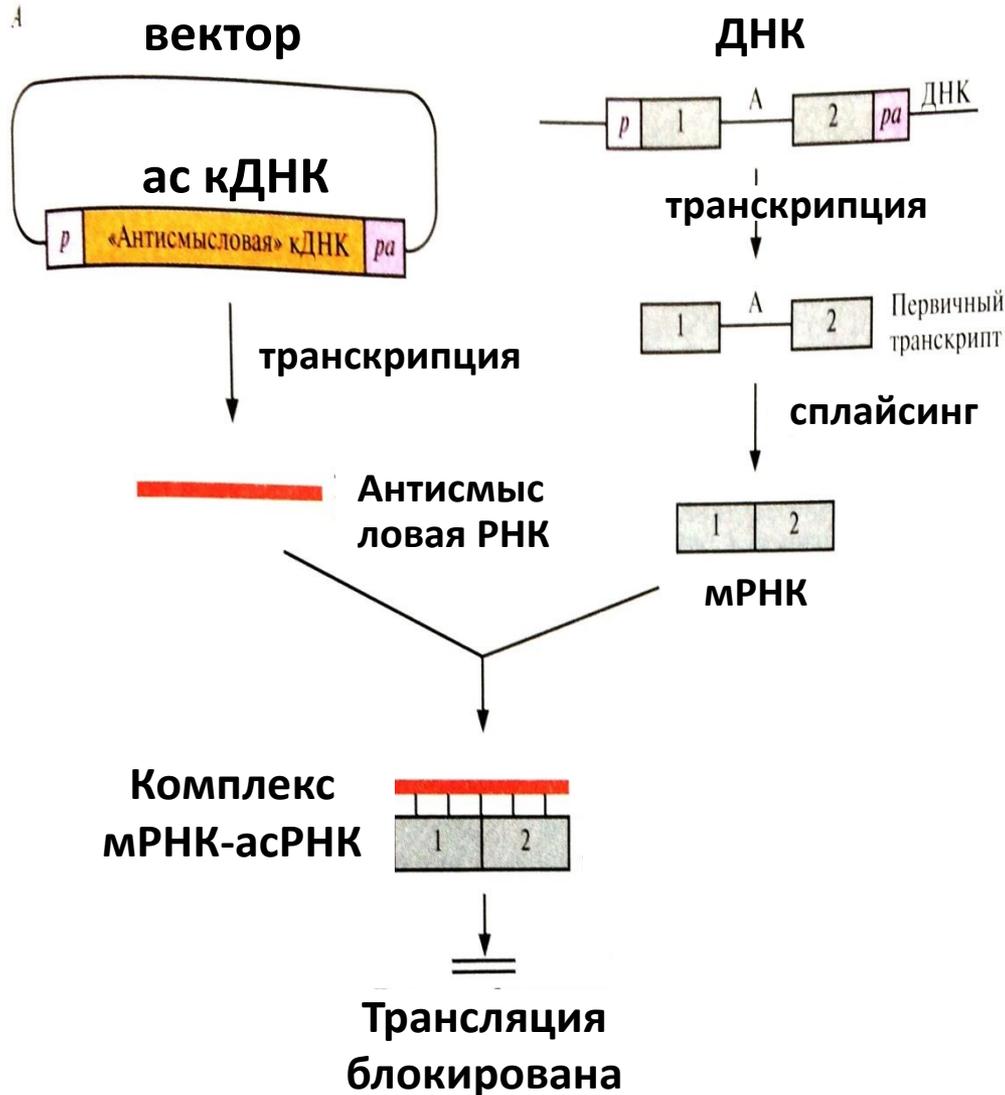
Использование искусственных хромосом

- *Введение нескольких генов или целых хромосомных локусов*
- *для производства человеческих антител и белков*
- *для скрининга лекарственных средств, влияющих на стабильность хромосом*
- *для оптимизации лекарственной терапии*
- *для идентификации новых генов*
- *для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток*

Лекарственные средства на основе олигонуклеотидов

- Многие заболевания человека связаны с гиперпродукцией нормального белка
- Для лечения разработаны терапевтические системы с использованием олигонуклеотидов:
 - ❑ Олигонуклеотид, который гибридизуется с геном и блокирует транскрипцию – антигенный
 - ❑ Олигонуклеотид, который гибридизуется с мРНК и блокирует трансляцию – антисмысловой

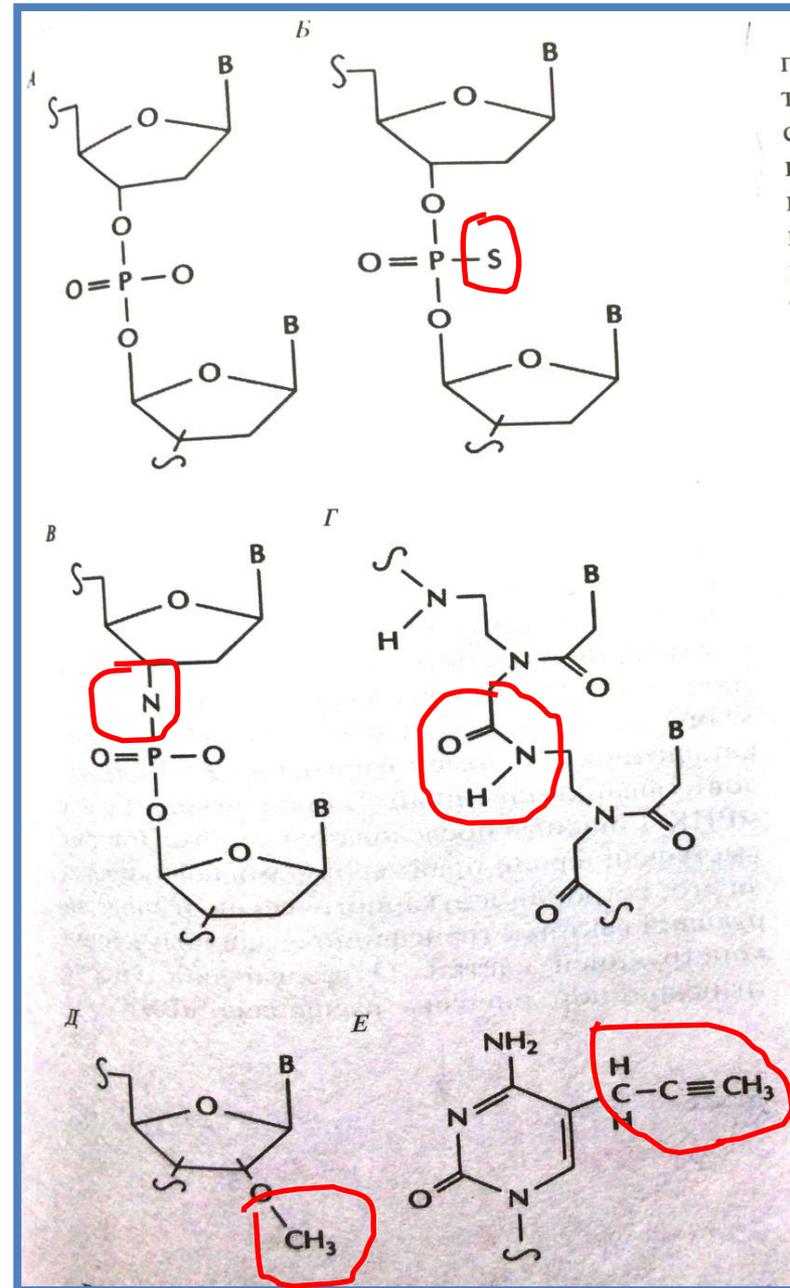
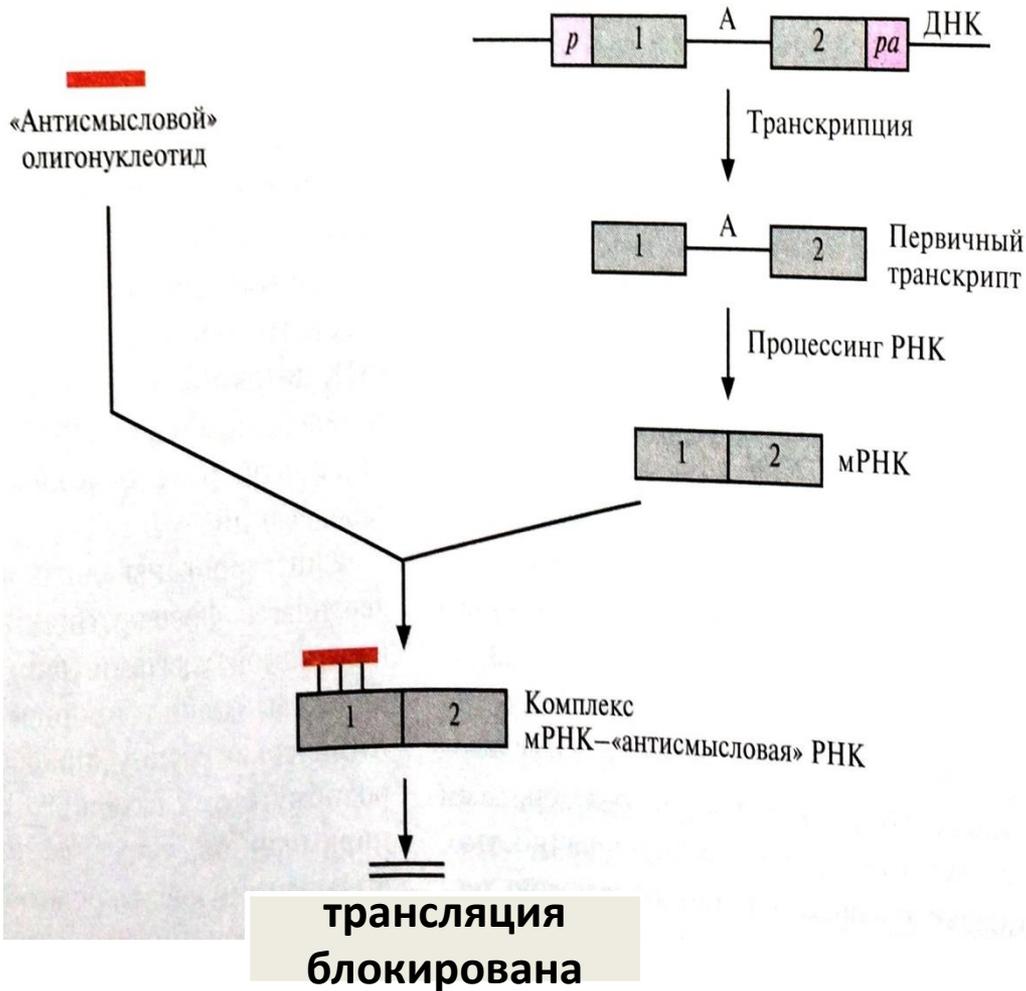
Векторы с антисмысловой кДНК



Основа метода: антисмысловая РНК должна связаться с определенной мРНК и ингибировать трансляцию.

1. Вектор несет вставку ДНК в антисмысловой ориентации по отношению к мРНК
2. Вектор трансфецируют в клетки, в которых транслируется мРНК
3. После синтеза антисмысловой РНК она гибридизируется с мРНК-мишенью и блокирует трансляцию

Антисмысловые нуклеотиды как лекарственные средства



Генодиагностика

- **Генодиагностика** — это совокупность методов, позволяющих обнаруживать генетические изменения (дефекты) в клетках, а также выявлять по специфическим генам возбудителей болезней на ранних этапах заболевания
- **Заболевания:** наследственные, соматические, инфекционные
- **Методы:**
 - Гибридизационные ДНК-зонды
 - ПЦР-амплификация
 - ДНК-секвенирование

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

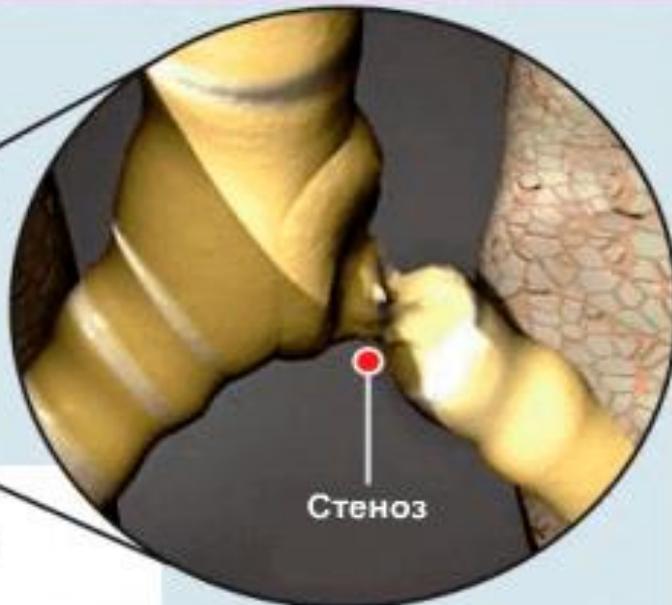
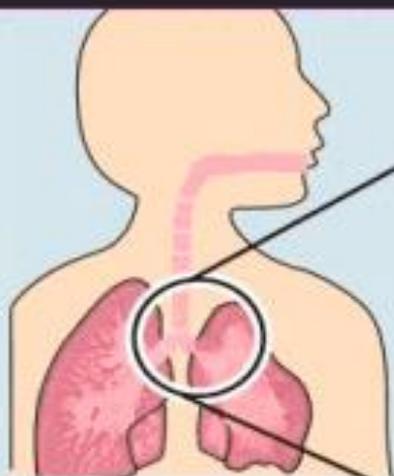
- **Клеточная инженерия** - конструирование живых, функциональных клеток или тканей для трансплантации пациенту с целью регенерации поврежденной ткани.
- **Такие клетки** восстанавливают метаболические функции в отличие от имплантов из инертных материалов, которые устраняют механические недостатки поврежденных тканей
- **Клеточная инженерия** основана на выделении и культивировании клеток высших многоклеточных организмов:
 - ***Первичные клетки*** — это зрелые клетки определенной ткани
 - ***Стволовые клетки***— недифференцированные клетки, которые способны к дифференцировке в различные типы специализированных клеток
 - ***Эмбриональные стволовые клетки*** образуются из внутренней клеточной массы развития зародыша
 - ***Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки*** получают из покровных тканей человека

Стратегия клеточной инженерии

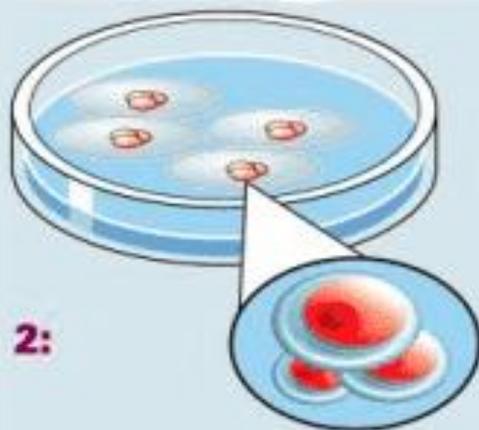
- Отбор и культивирование собственных или донорских стволовых клеток
- Разработка специального носителя для клеток (матрицы) на основе биосовместимых материалов
- Нанесение культуры клеток на матрицу и размножение клеток в биореакторе со специальными условиями культивирования
- Внедрение конструкции в область пораженного органа для дозревания и формирования микроциркуляции внутри конструкции (префабрикация)
- После имплантации матрикса в организм хозяина он через некоторое время полностью исчезает, а в месте дефекта останется только новая ткань.

Операция по пересадке пациентке трахеи

Первая в мире успешная трансплантация созданного *in vitro* биоинженерного эквивалента трахеи



1: Стеноз левого бронха - incurable патология у пациента



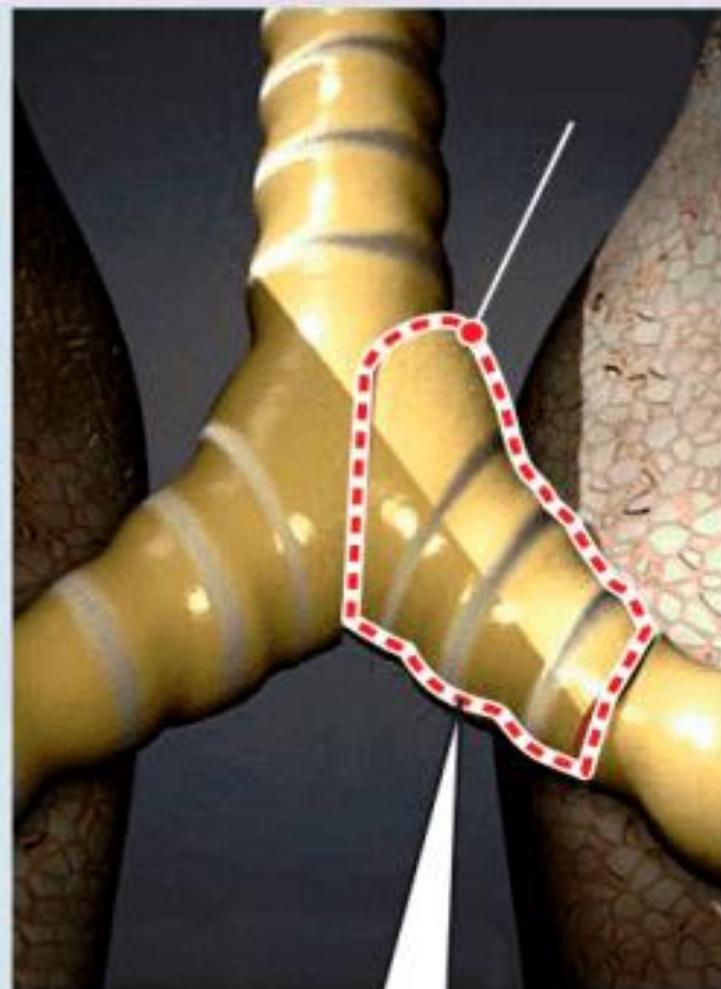
2:

Культивирование клеток пациента *in vitro*



3:

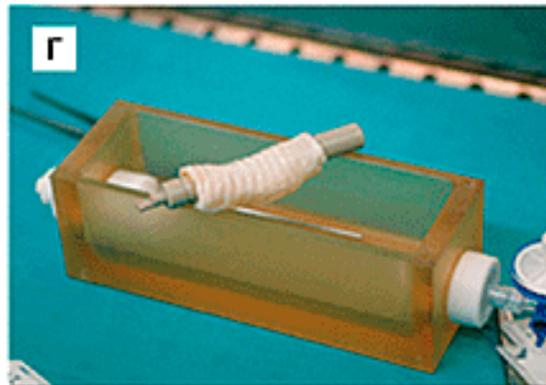
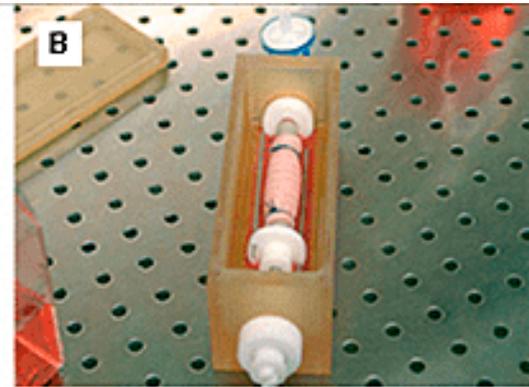
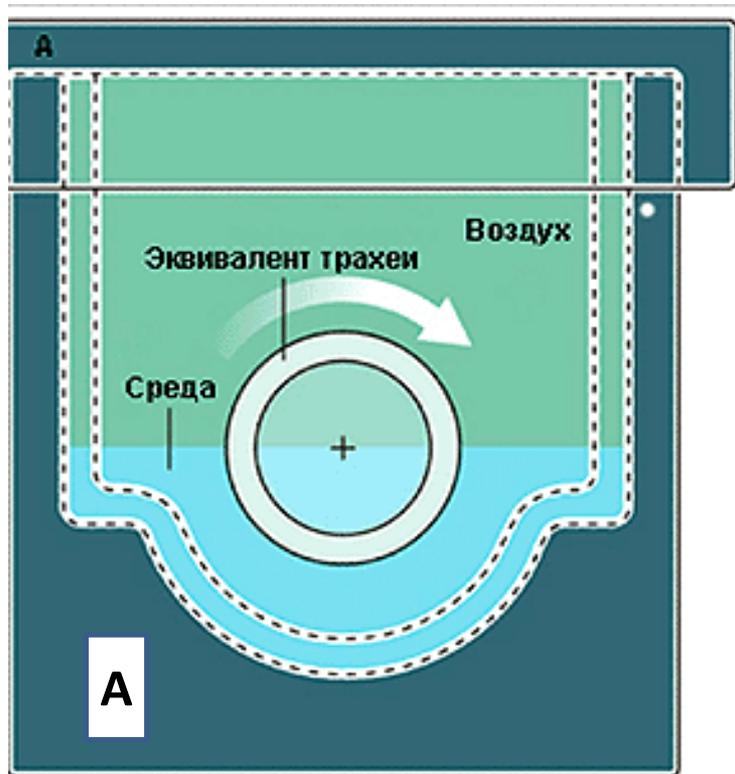
Создание *in vitro* биоинженерного эквивалента из клеток пациента и трупной трахеи, предварительно подвергшейся девитализации

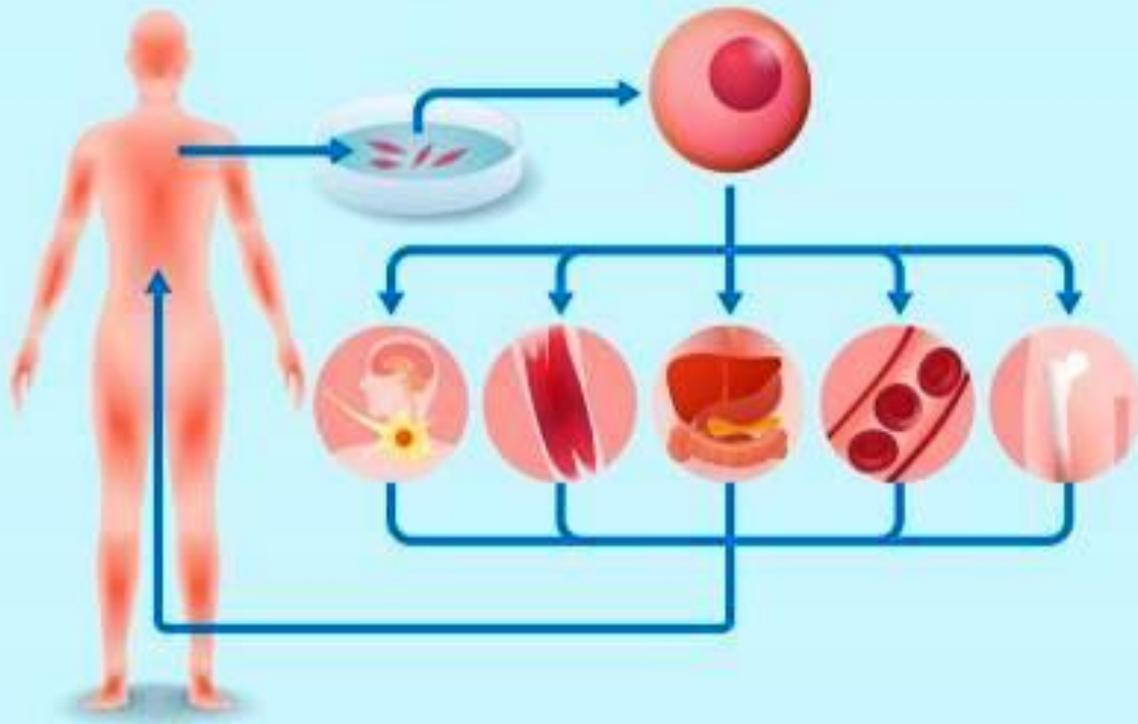


4:

Резекция бронха в месте стеноза и трансплантация биоинженерного эквивалента

Биореактор для создания тканеинженерного эквивалента трахеи. *А* — схема биореактора, вид с боку. *Б* — герметизация биореактора. *В* — биореактор с тканеинженерным эквивалентом трахеи *in situ*. *Г* — биореактор после удаления эквивалента трахеи. *Д* — вид эквивалента трахеи непосредственно перед операцией.



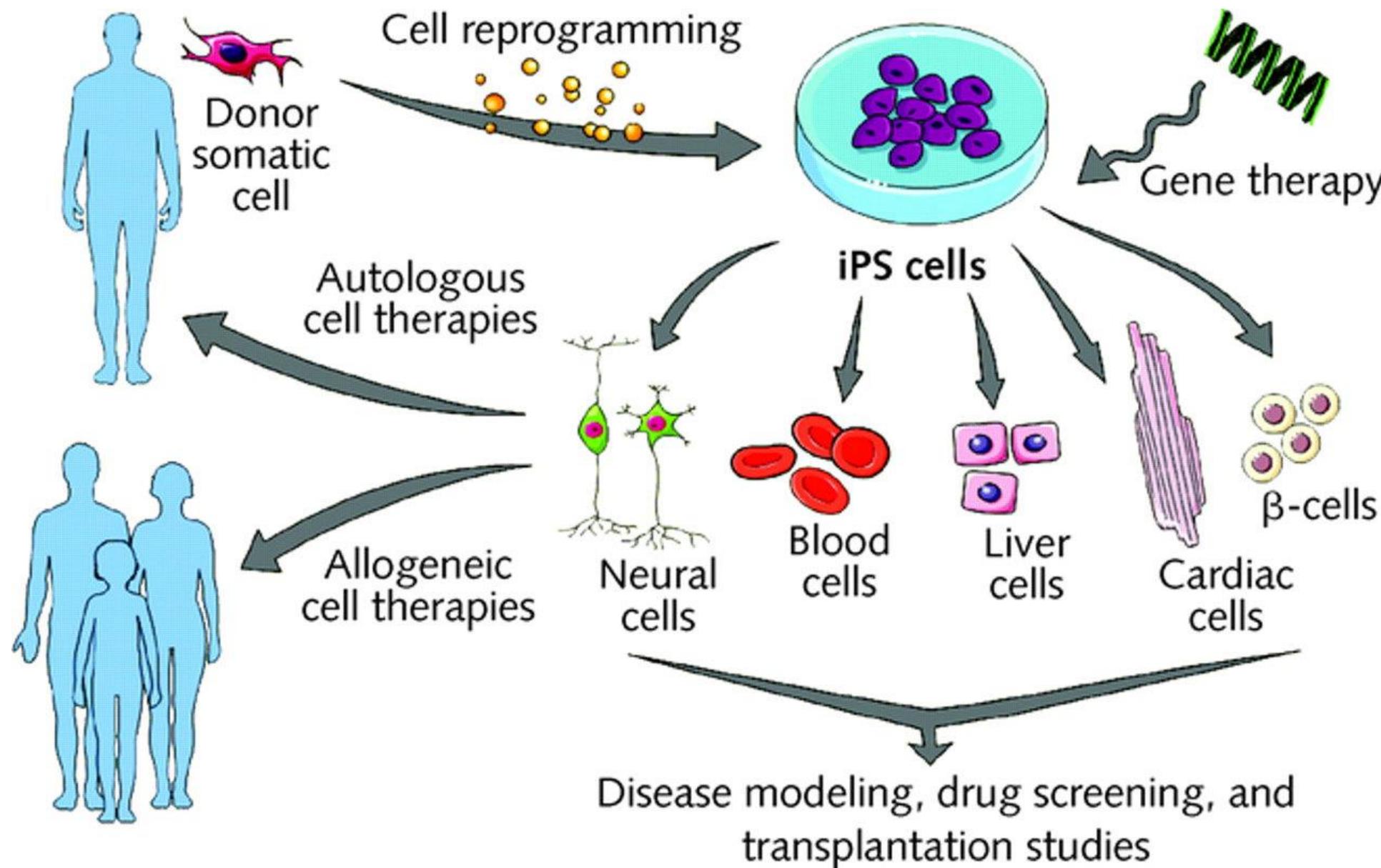


Регенеративная медицина
это восстановление повреждённой ткани с помощью активации стволовых клеток или с помощью трансплантации клеток (клеточной терапии)

- **Регенеративная медицина** — выращивание новых органов из стволовых клеток пациента с последующей заменой ими пришедших в негодность частей организма
- **В клиниках это делают пока только с несколькими не сложными органами: трахеей, пищеводом, сосудами**

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

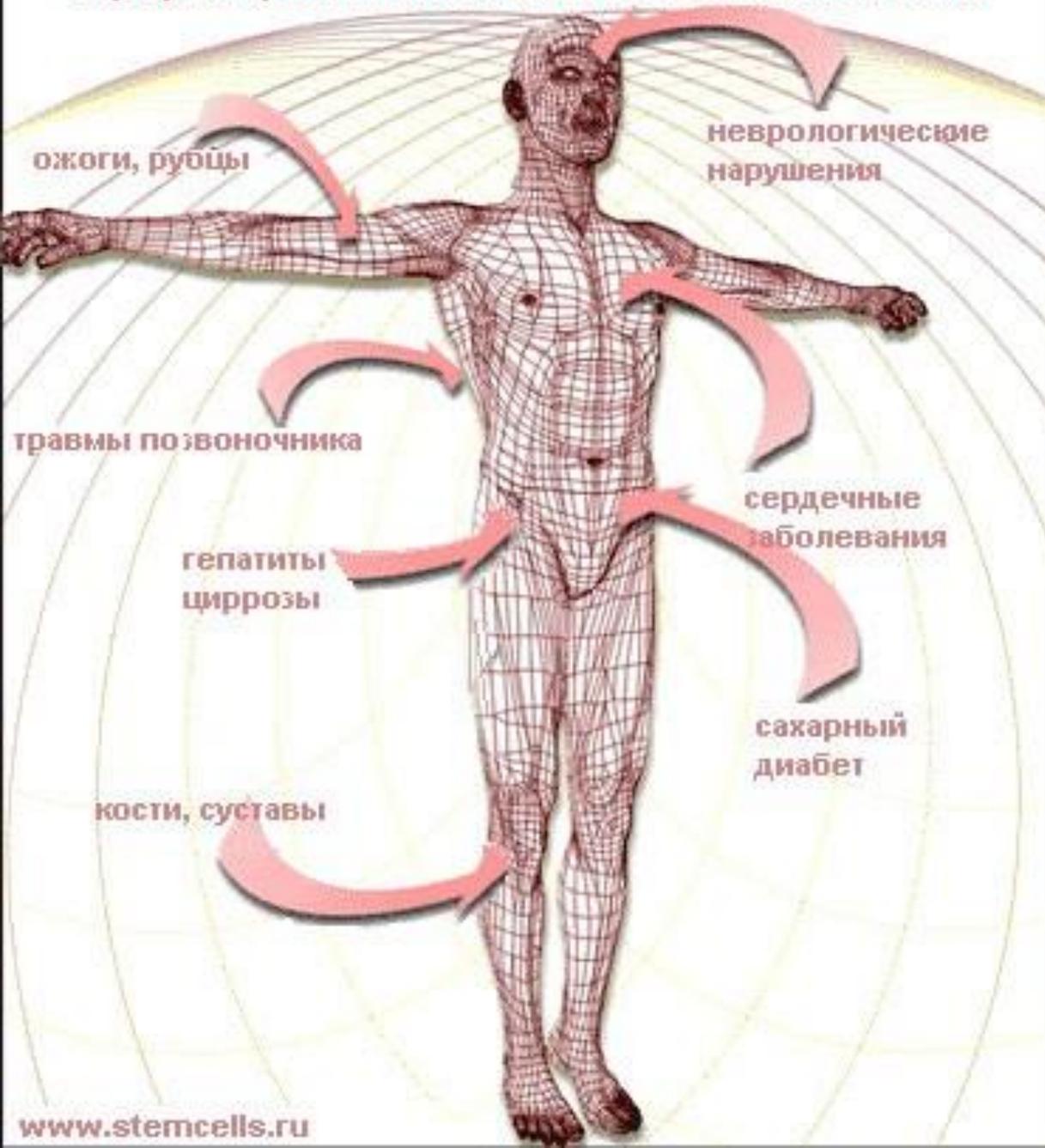
- ❑ **Выращивание органов** — перспективная биотехнология, целью которой является создание жизнеспособных органов для человека
- ❑ Технология не применяется на людях, все попытки трансплантации пока безуспешны, идут активные разработки и эксперименты
- ❑ Учёные научились выращивать органы из стволовых клеток, названные органоидами
- ❑ Они используются для моделирования органогенеза, опухолей и различных заболеваний, тестирования лекарственных препаратов и действия токсичных веществ, в экспериментах по терапии повреждённых органов



Выращивание органов и тканей из стволовых клеток

- Японские ученые первыми вырастили полноценные капиллярные **кровеносные сосуды** из стволовых клеток человеческого эмбриона (2004)
- Швейцарские ученые вырастили **клапаны человеческого сердца** из стволовых клеток (2006)
- Британские ученые первыми вырастили искусственную **печень** из стволовых клеток пуповинной крови (2006)
- Американские ученые вырастить полноценный **мочевой пузырь**. В качестве материала были использованы клетки пациентов, нуждающихся в пересадке (2006)
- Японские ученые вырастили **зуб** из стволовых клеток (2007)

Сферы применения клеточных технологий

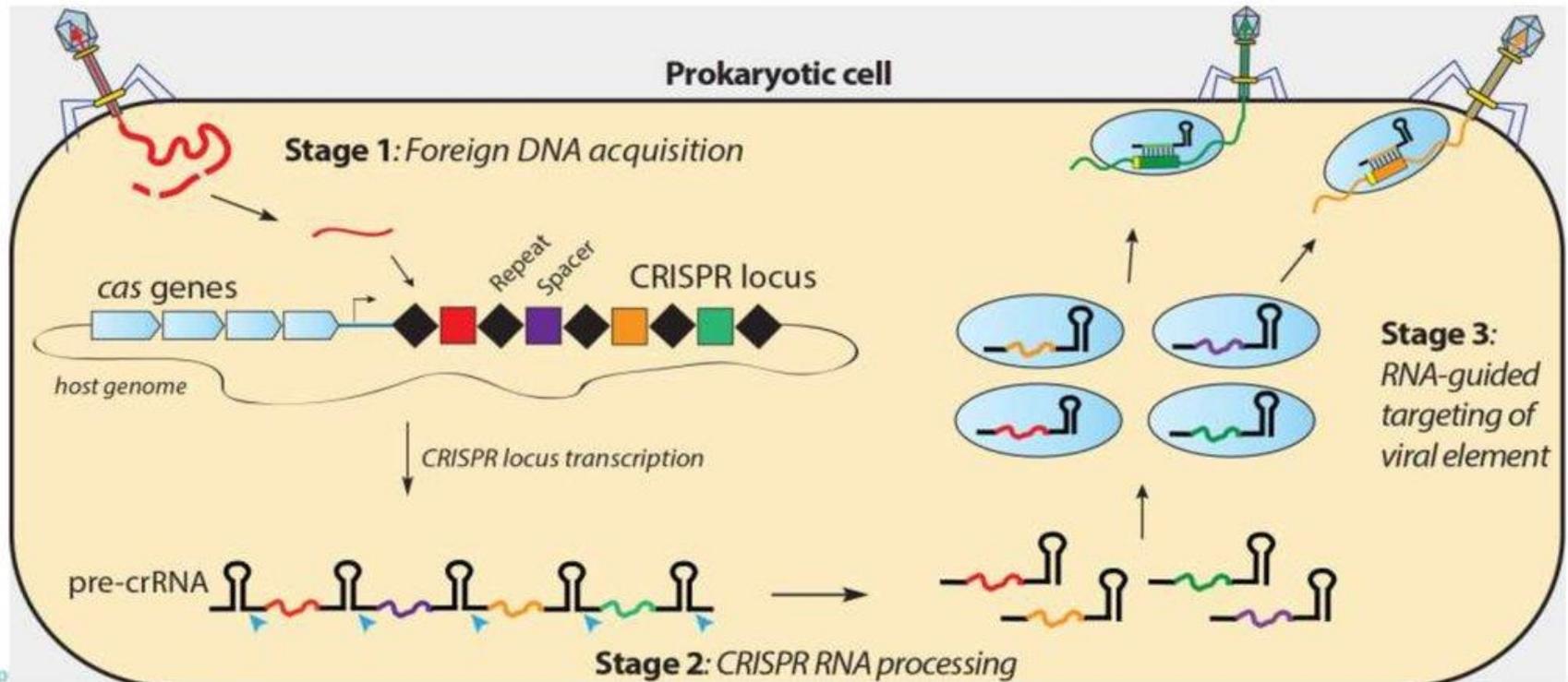


КАКИЕ
БОЛЕЗНИ
МОЖНО
ЛЕЧИТЬ С
ПОМОЩЬЮ
КЛЕТОЧНОЙ
ТЕРАПИИ?

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ

CRISPR-Cas9

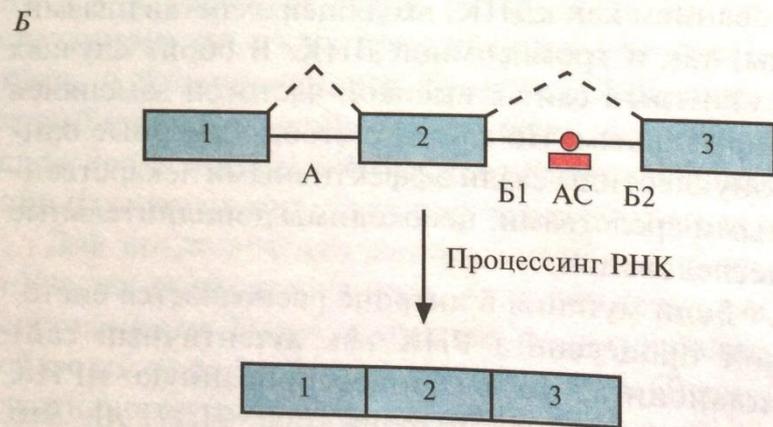
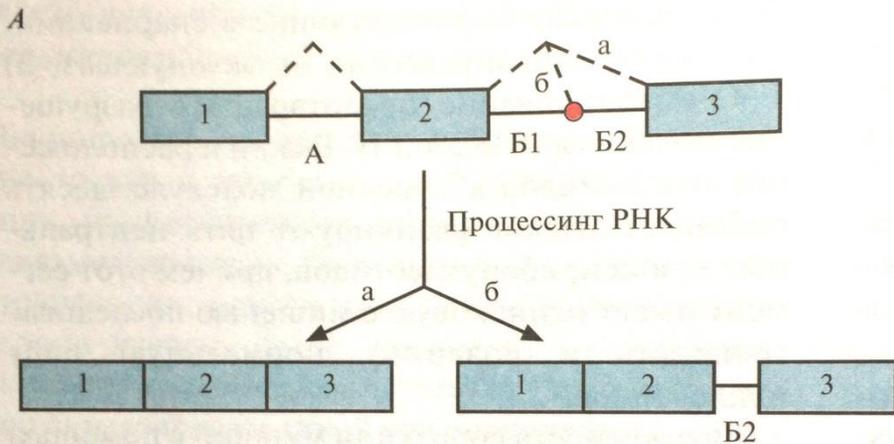
- clustered regularly interspaced short palindromic repeats
- Система адаптивного иммунитета бактерий и архей



Как лечить болезни с помощью CRISPR/Cas9

- Чтобы исправить «неправильный» ген нужен молекулярный «скальпель», который найдет мутантную последовательность нуклеотидов и сможет «вырезать» ее из ДНК
- Таким «скальпелем» является нуклеаза Cas9. С помощью РНК-гида, последовательность которой совпадает с искомым сайтом, Cas9 вносит разрыв в нужное место генома. Узнавание мишени происходит на участке длиной в 20–30 нуклеотидов
- Разрыв в ДНК будет исправлен по здоровой копии из парной хромосомы за счет репарации ДНК. Если парной хромосомы нет (как в случае гемофилии) можно внести в клетку участок «правильного» гена одновременно с Cas9 и РНК-гидом и использовать его как матрицу для лечения внесенного разрыва
- С помощью CRISPR/Cas9 можно делать мультиплексное редактирование сразу нескольких неправильных генов. Для этого ввести белок Cas9 и несколько разных РНК-гидов. Каждый из них направит Cas9 к собственной мишени, и вместе они устранят генетическую проблему.

Коррекция дефектов, связанных с нарушением сплайсинга



Коррекция дефекта, приводящего к нарушению сплайсинга, с помощью антисмыслового олигонуклеотида

1. Результат мутации приводит к ошибочному сплайсингу:
А – первый интрон, Б – второй интрон с мутацией (красный кружок), разделяющей его на две части (Б1 и Б2)
2. Штрихом обозначены сегменты, вырезаемые при процессинге
3. В результате мутации два варианта сплайсинга – с образованием функциональной мРНК и РНК, включающей часть второго интрона
4. Антисмысловый олигонуклеотид связывается с мутантным сайтом сплайсинга и препятствует его опознаванию при процессинге, образуется только функциональная мРНК