

Гендік терапия

- **Гендік терапия** – ақау генді алмастырып немесе қапына келтіріп, толық гендік өнімді экспрессиялайтын және мутантты немесе бөтен геннің жұмысын бұғаттау қабілетіне ие генетикалық құрылымды ағзаға енгізу арқылы гендегі ақауларды емдеудегі биомедициналық технология жиынтығы.
- Гендік терапия молекулалық биологияның, гендік және жасушалық инженерияның, сонымен қатар ақпараттық технологияның жетістіктеріне негізделген.

- Гендік терапия әдісі бойынша бірінші клиникалық сынақтар 1989 жылы 22 мамырда прогрессияланушы меланома жағыдайында ісік-инфилтрлеуші лимфоциттерді генетикалық маркирлеу мақсатында жүргізілді.
- Тұқымқуалайтын ауыр иммунодефицит гендік терапия әдістері қолданылған алғашқы тұқымқуалаушы ауру ретінде табылды. Ол аденозиндезаминаза геніндегі мутациямен шартталған. 1990 жылы 14 қыркүйекте Френч Андерсонның жетекшілігімен осы аурумен ауыратын төрт жастағы қызға оның өзінің лимфоциттері тасымалданды.

Гендік терапияның түрлері

- **Нәрестелердегі генотерапия**
- Терапияның бұл түрінде генетикалық құрылымды зиготаға немесе эмбрионға дамудың ерте сатысында енгізеді (in utero жағдайында гендерді енгізу). Енгізілген материал реципиенттің барлық жасушасына түседі деп күтіледі (келесі ұрпаққа тасымалдай отырып, тіпті жыныс жасушаларына да түседі).

- **Соматикалық генотерапия**
- Бұл әдісте генетикалық материалды тек соматикалық жасушаға енгізеді және ол жыныс жасушаларына берілмейді. Соматикалық гендік терапияда генетикалық конструкция жүйелі түрде – in vivo (вена ішілік, бұлшықет ішілік) және локальды – in situ (тамырлар, мүшелер, ісіктер) енгізіледі және терапевтік хаттаманың негізін құрайды.

- **Ағзаға терапевтік құрылымды енгізу әдістері**

- ***In vivo технологиясы*** (қан арқылы жүйелі енгізу) әзірше практика жүзінде жүзеге асқан жоқ. бұл потенциалды нысана – ұлпаның көптігімен туындаған терапевтік хаттамаларды жасаудағы қиыншылықтармен байланысты (тері, бұлшықет, өкпе, ми, бауыр, қан жасушасы, т.б.). Өртүрлі нысаналардың көптүрлігі генетикалық құрылымды жеткізудің арнайы және эффективті жүйесін құрастыруды талап етеді.
- ***In situ жағдайындағы гендік терапия.*** Бұл технология генетикалық құрылымның локальды тасымалдануына негізделген.
- ***Ex vivo жағдайындағы гендік терапия.*** Бұл технология науқастың өзінің жасушасының трансплантациялануына негізделген. Бұл әдісте ағзадан жасушаны алып, оған қажетті генетикалық ақпаратты енгізіп сосын сол ағзаға қайтан енгізеді.

in situ жағдайындағы гендік терапияға мысалы:

- Тыныс жолының эпителиіне аденовирустық вектор құрамы арқылы терапевтік генді локальды енгізуге негізделген мусковисцидоздың гендік терапиясы;
- Қатерлі жаңа түзіліске терапия жасау жағдайында ісік массасына гендік инженерлік құрылымды енгізу.
- Бұл енгізу әдісіне екі жағдай қажет: біріншісі нысана-жасуша оңай қолжетімді болуы керек, екіншісі генетикалық құрылым арнайы тікелей нысана-жасушаға еніп, ұзақ уақыт бойы және жоғары деңгейде терапевтік генді экспрессиялай алуы тиіс.

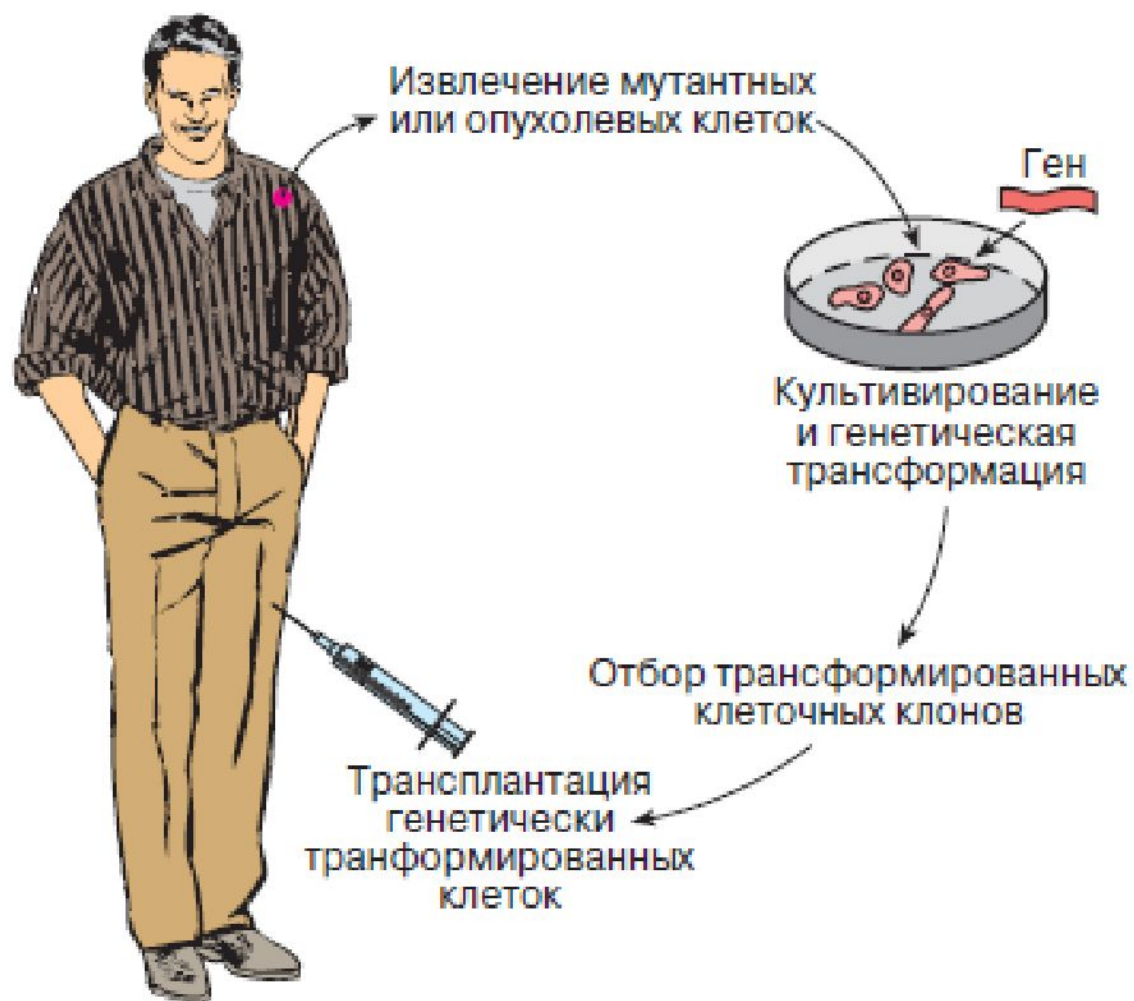
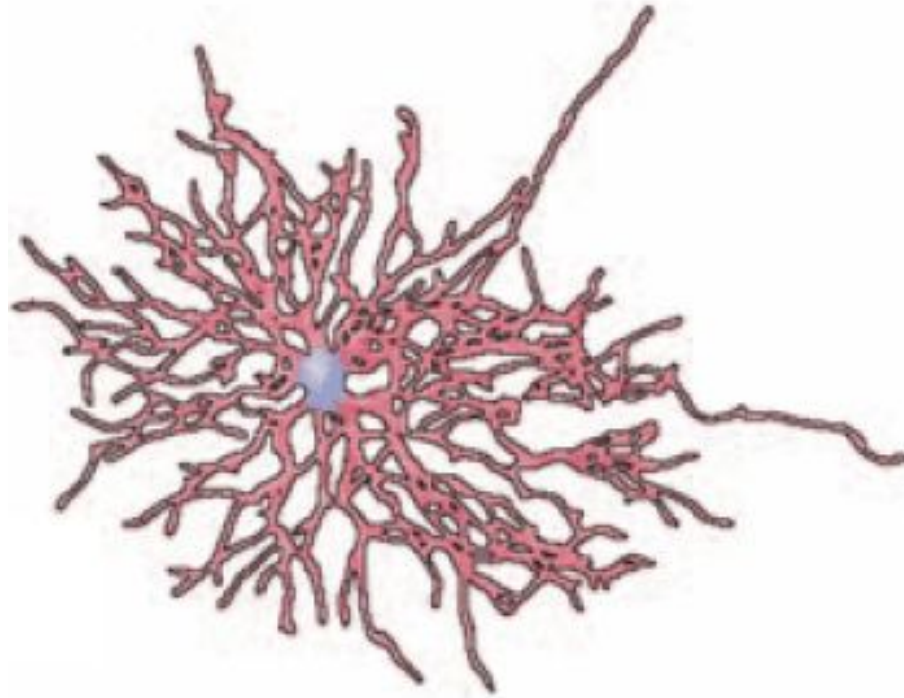
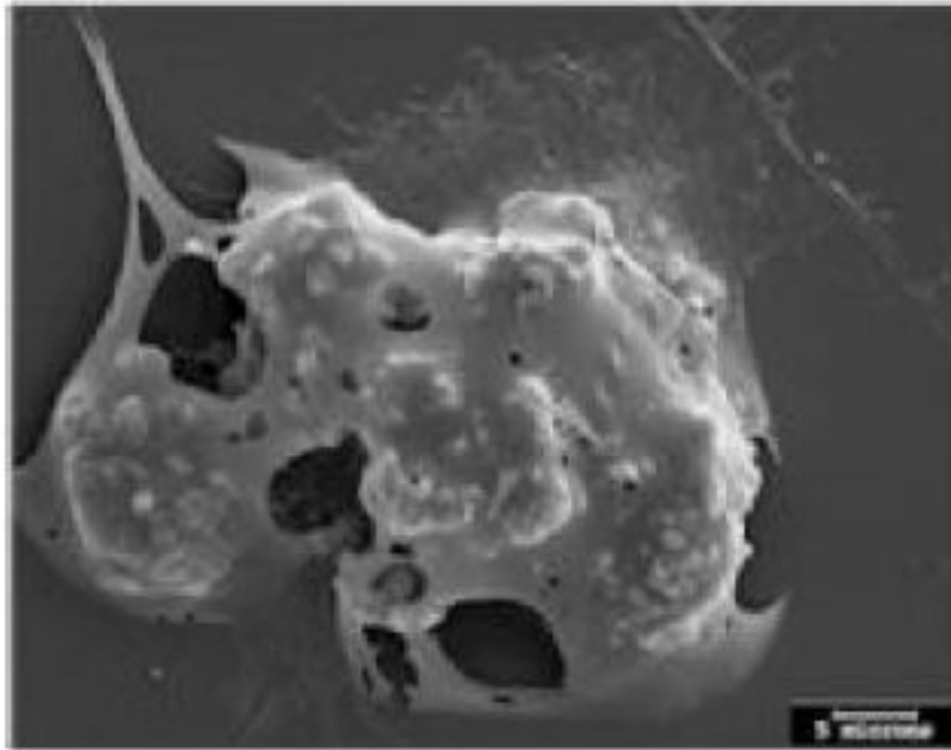


Рис. 1. Генотерапия способом *ex vivo*. Клетки получают от пациента, культивируют *in vitro*, проводят их генетическую трансформацию, отбирают нужные клоны клеток и возвращают в организм пациента. В случае опухолей клетки трансформируют генами, резко усиливающими иммунный ответ организма, облучают и трансплантируют подкожно тому же пациенту



- *ex vivo* жағдайында стратегия жүзеге асу үшін генетикалық ақпаратты тасымалдау құралы ретінде аутогендік біріншілік жасушалар қолданылуы мүмкін (бластоциттер). Бірінші тәжірибе біріншілік астроциттермен жүргізілді, олар ересек донордан алынып, трансфецирленген жәнесодан кейін орталық жүйке жүйесінің ұлпасына орналастырылған, ол жерде бұл жасушалар енгізілген геннің ұзақ экспрессиясын бір қалыпты ұстап тұрған.



- Фибробласт өте жақсы суррогат жасуша ретінде табылған. Олар культурада ұзақ пролиферациялану қабілетіне ие, донорларда іріктеу үшін оңай қолжетімді, енгізілген геннің экспрессиясы толық қанды жүреді. Соңғы жылдары гендік терапиядағы әртүрлі аурулар үшін фибробласттарды қолдануға бағытталған көптеген тәжірибелер жүргізілген.



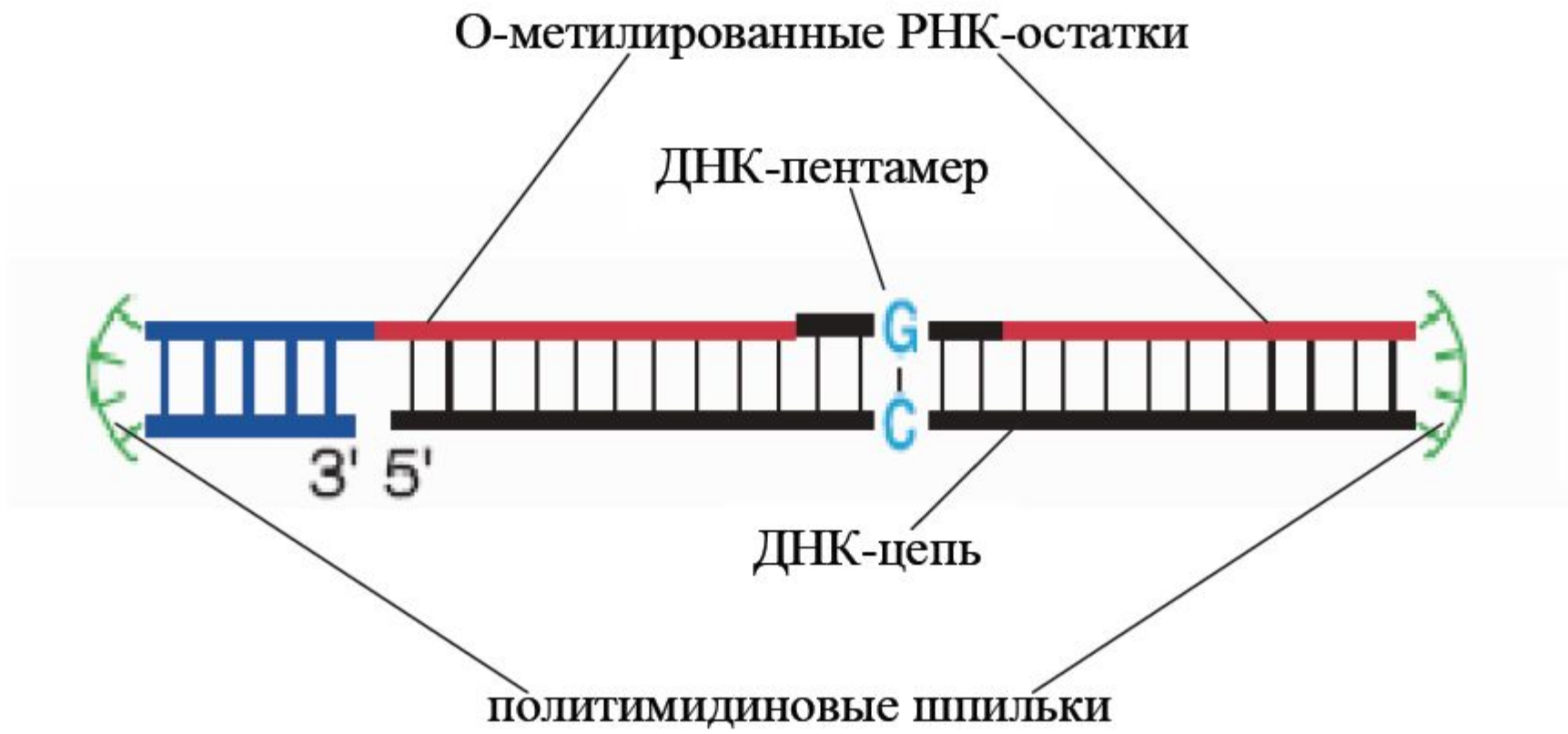
- Ағзаның кез келген ұлпасымен жоғары сәйкестігі дін жасушаларының негізгі ерекшелігіне жатады. Яғни енгізілген генетикалық құрылымның ұзақ мерзімді экспрессиясын ұстап тұру және дің жасушаларының ұзақ тіршілік етуін көрсетеді.

Гендік терапиялық құралдардың емдік әсерінің жетістіктері

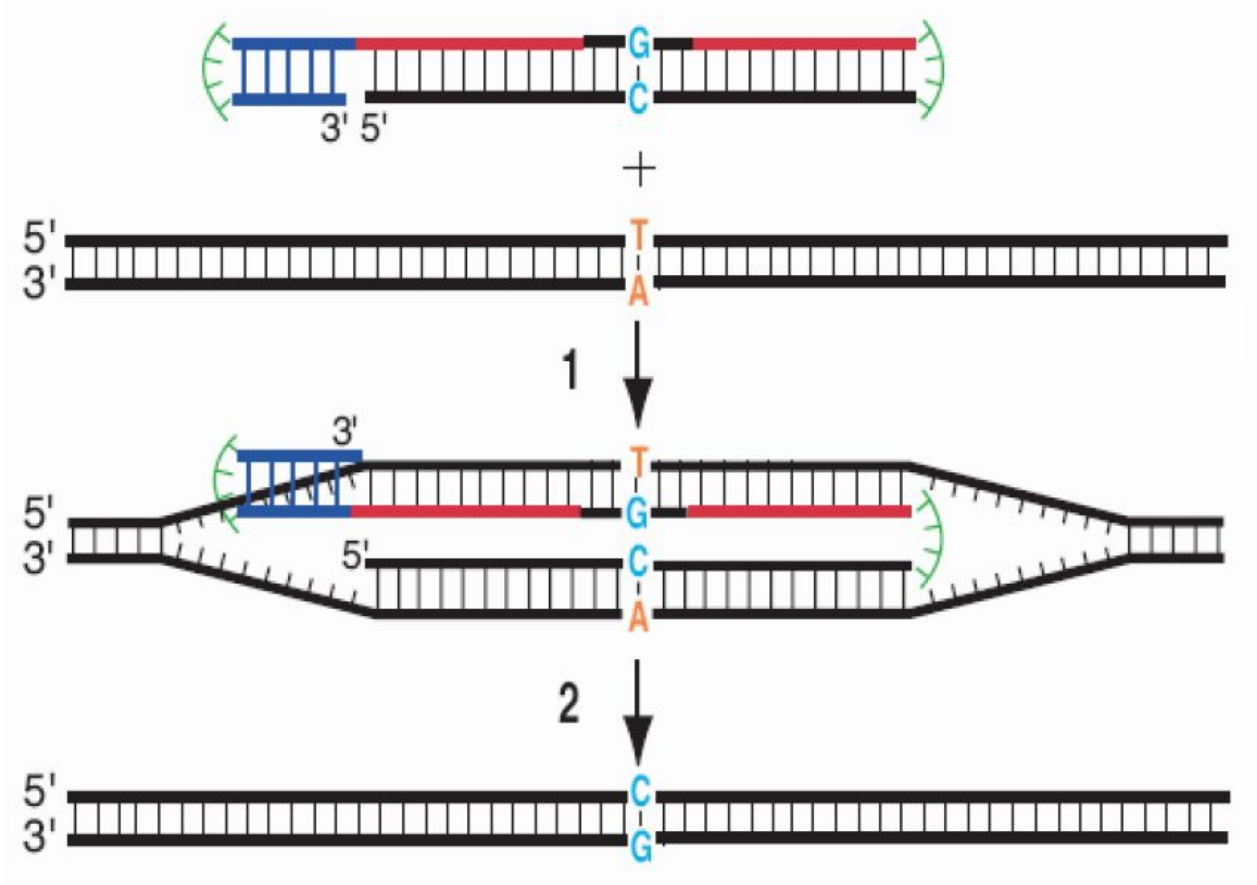
ПОЗИТИВТІ ГЕНДІК ТЕРАПИЯ

- Позитивті гендік терапия экспрессиясы жеткіліксіз немесе толықтай жойылған геннің функциясын қалпына келтіруге бағытталғана. Көп жағдайда позитивті гендік терапияның әртүрлі әдістері зақымдалған генді түзетуге бағытталған.

- **1. хромосомалық ДНҚ деңгейінде генді түзету**
- ***Геннің функциясын оны алмастыру арқылы немесе қосарлану арқылы қалпына келтіру.*** Бұндай әдіс рецессивтік тұқымқуалаушылық ауруларды емдеу кезінде қолданылуы мүмкін.
- ***Химерлік олигонуклеотидтерді пайдалану арқылы генетикалық ақауларды репарациялы түзету.***
- **2. Енгізілген геннің хромосомадан тыс экспрессиясы**
- Хромосомалық ДНҚ деңгейінде геннің ақауларын түзетумен байланысты әдістемелік қиыншылықтар және жасушаның генетикалық ақпаратқа араласуын болжай алмаушылық позитивті гендік терапияның осы бағытының дамуын тежейді. Осыған байланысты хромосомадан тыс экспрессиялана алатын немесе хромосоманың арнайы орындарына орналаса алатын қалыпты функционалды белсенді генді ағза жасушасына егізу әдістері жақсы дами бастады.



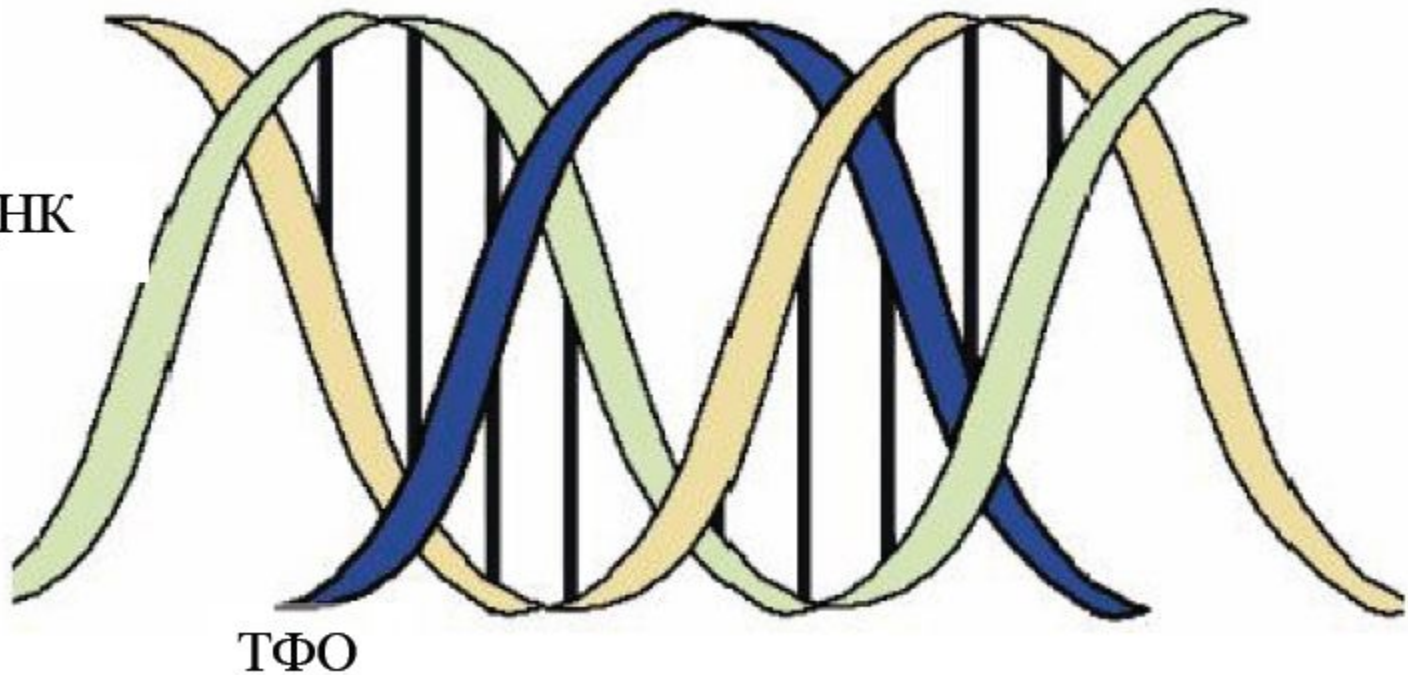
Химеропласт



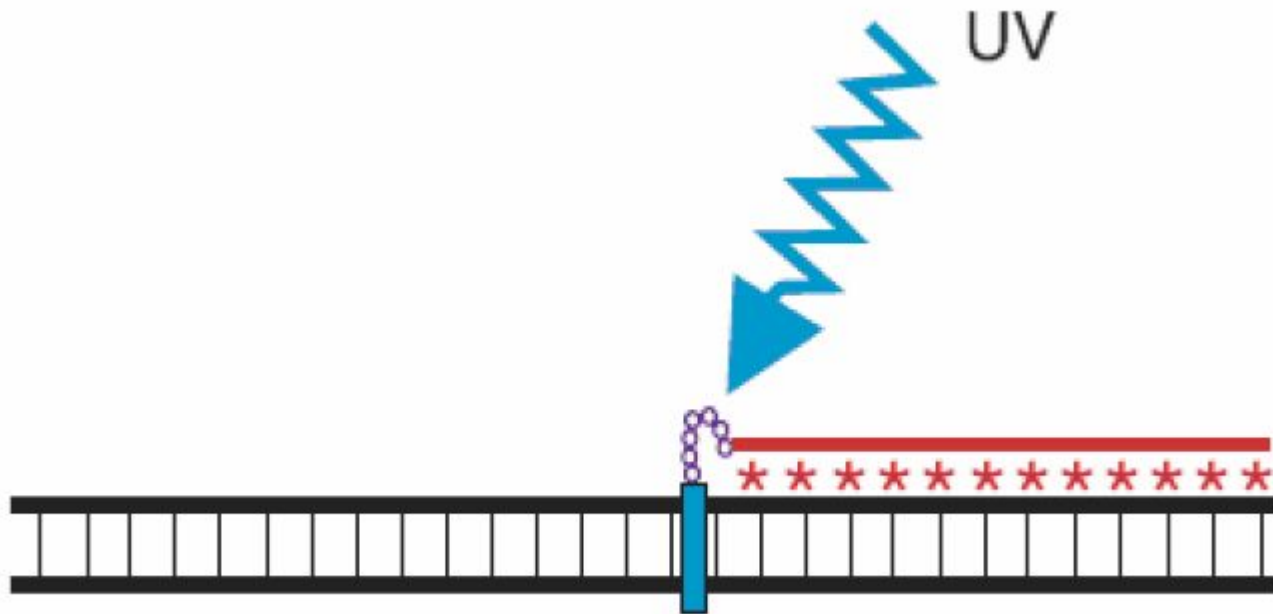
- Сайт-спецификалық гомологиялық рекомбинация процесіндегі химеропластарды пайдалану арқылы генетикалық ақауды түзету

- **Химеропластияны жүргізу кезінде туындайтын негізгі мәселелерге жатады:**
- Белгілі бір ақаудың молекулалық-генетикалық сипаты және оны анықтау;
- Арнайы химеропластты құрастыру;
- Химеропласттың рекомбиназалық белоктармен байланысуы үшін жағдай жасау;
- Репарация жүйесін қосу.

молекула ДНК

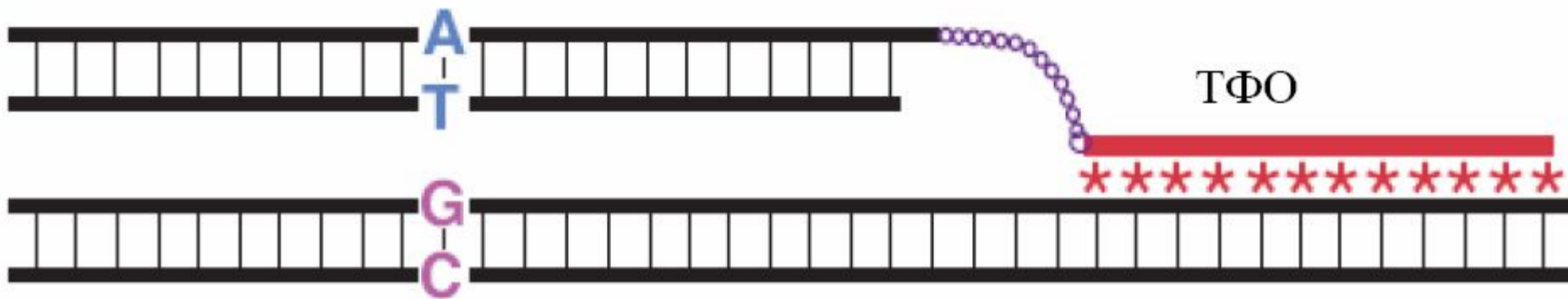


- ТФО қатысуымен ДНҚ-ның үшіншілік құрылымын қалыптастыру



- Псораленмен бірге тігілген триплекстүзуші олигонуклеотидтер

нормальный фрагмент

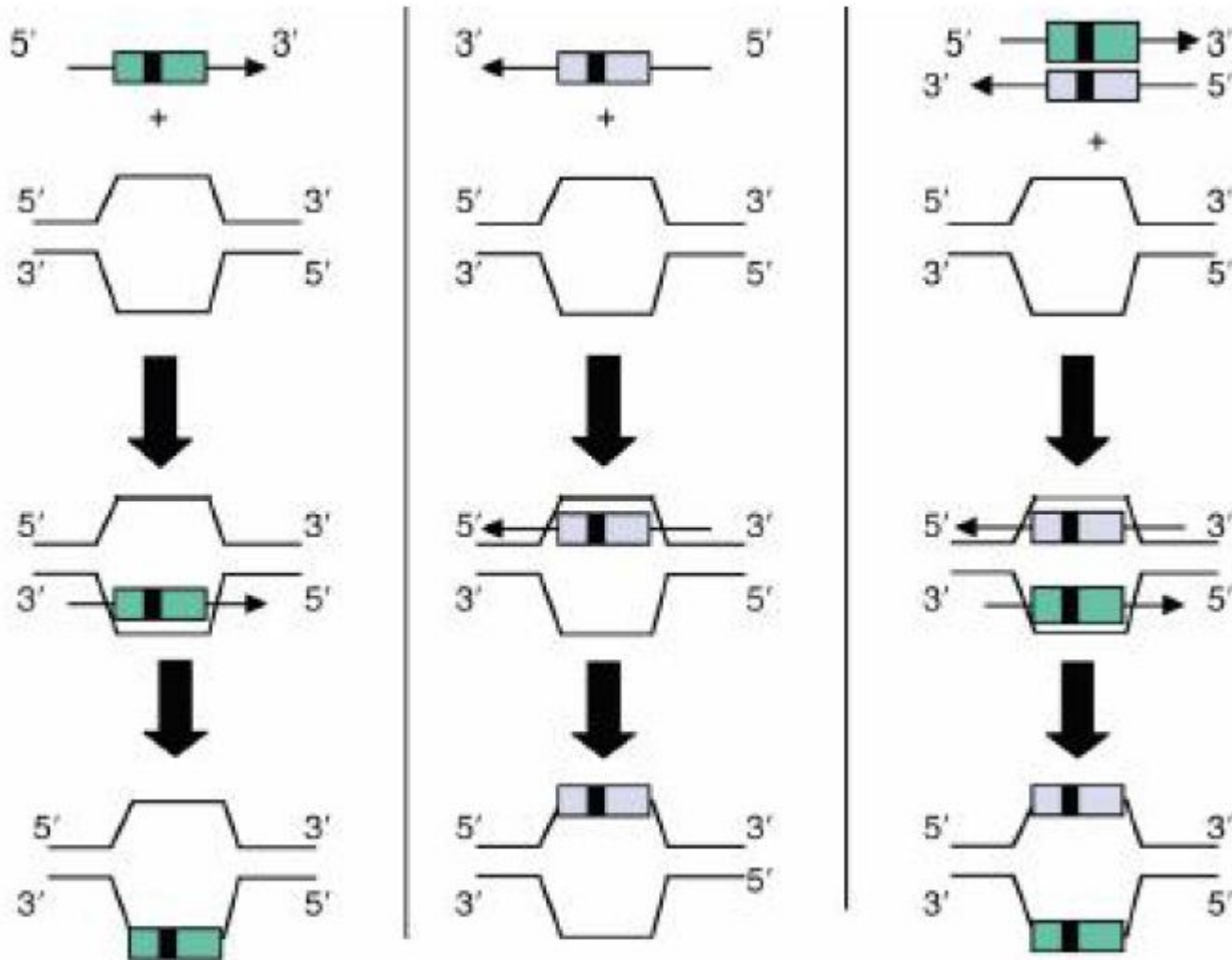


дефектный фрагмент ДНК



восстановленный участок ДНК

- ТФО-индуцируется рекомбинация



- Бір тізбекті және екі тізбекті ДНҚ-фрагменттерінің қатысуымен болатын гомологиялық рекомбинация нұсқалары

Енгізілген геннің хромосомадан тыс экспрессиясы

- Ағза жасушасына хромосоманың арнайы орындарына орналасып, хромосомадан тыс экспрессиялана алатын қалыпты функционалды белсенді генді енгізу әдісі жақсы дамуда.

Хромосомадан тыс гендік терапияның жасалуына мынандай білімдерді игеру әсерін тигізді:

- Тұқымқуалайтын, онкологиялық, басқа ауруларға жауапты геннің біріншілік құрылымы туралы;
- Осы гендердің метаболизмдегі қызметі мен рөлі туралы;
- Хромосомадағы геннің орналасуы мен оны қоршағандар туралы (реттеуші элементтердің болуы).

Рекомбинанттық ДНҚ технологиясының кезеңдері:

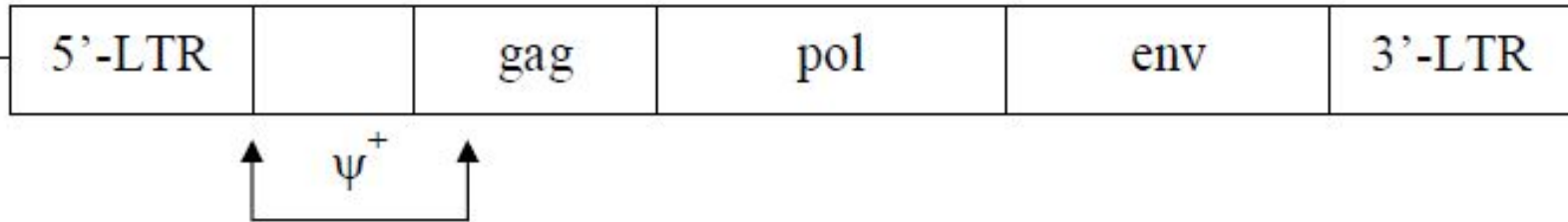
1. Реттеуші тізбегінен терапиялық генді бөліп алу. Қазіргі таңда бұл кезең полимеразалық тізбектік реакция әдісін пайдаланудың арқасында әлдеқайда жеңілдетілді.
2. Қойылған мақсатты қанағаттандыратын векторлық ДН-ны құрау немесе таңдау.
3. Реттеуші элементтерді бөліп алу немесе жасанды синтездеу.
4. Қажетті тізбекте және бағытта ДНҚ фрагменттерін лигирлеу.
5. Оптималды жасушада конструкцияны клондау және рекомбинантты клондарды іріктеу.
6. Ген экспрессиясының әсерін және оның өнімінің қасиетін тексеру.

Трансфекция мыналарды қолдану арқылы жүруі мүмкін:

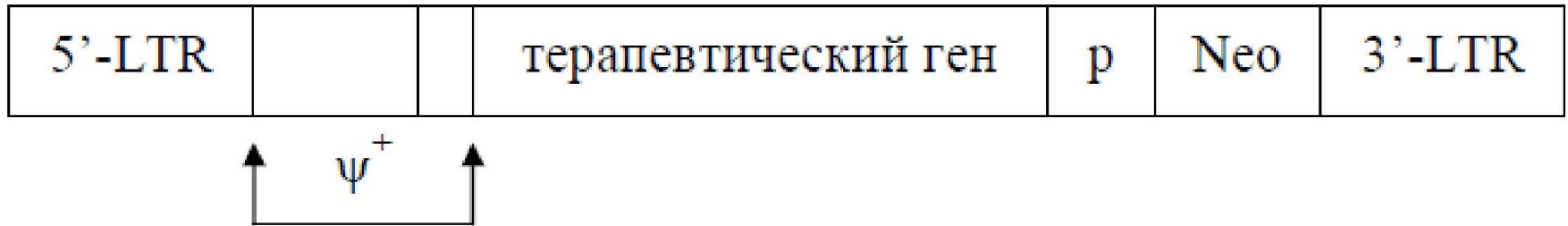
- таза («жалаңаш» - ағылш. naked) ДНҚ-ны;
- Сәйкес плазмидаға салынған ДНҚ –ны немесе комплекстелген ДНҚ-ны (тұздармен, белоктармен, органикалық полимерлермен байланысқан плазмидалық ДНҚ);
- Репликация қабілетінен айырылған вирустық бөлшектердің құрамындағы ДНҚ

Геннің векторлық тасымалы

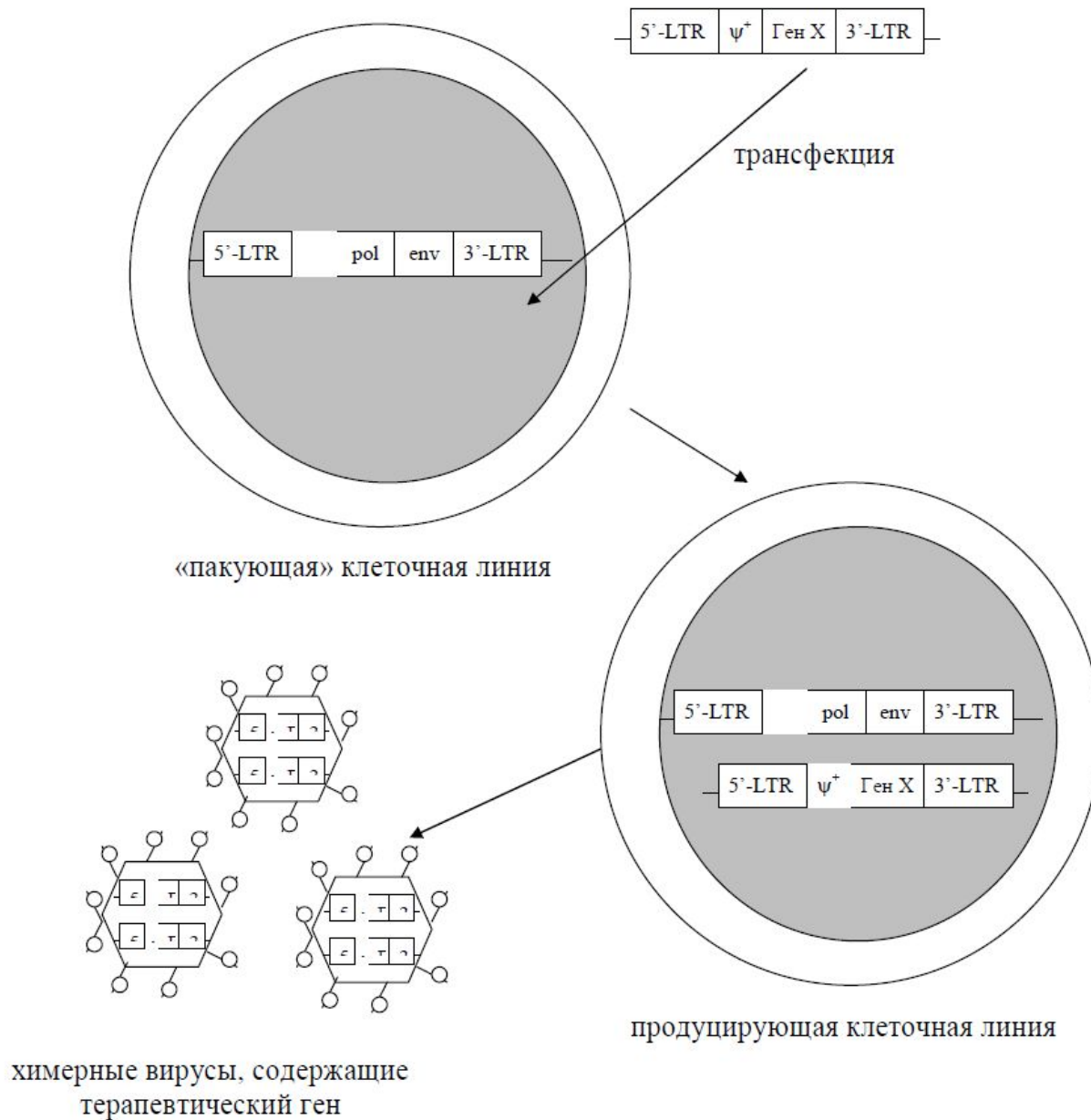
- Соматикалық генотерапия тәжірибелері кезінде көбінесе вирустық векторлар қолданылады.
- ***Ретровирустық вектор.*** Ретровирустар (сем. Retroviridae) –геномы жасуша геномына енетін инфекциялық агентте, ол оның қатерлі трансформациясына әкеледі.
- Ретровирус геномы өлшемі 7,5 м.н.н болатын екі РНҚ молекуласынан тұрады, олар мРНҚ түрінде ұйымдасқан.



- **Ретровирустың провирусының құрылымдық ұйымы**
- 5'-LTR – транскрипцияның реттеуші сигналын алып жүретін ұзын соңғы қайталау;
- 3'-LTR – полиаденилдеуді алып жүретін тізбек;
- ψ^+ - вирустық РНҚ-ны қаптау үшін қажетті пси+ тізбегі;
- gag – ішкі капсидтің құрылымдық белогын кодтаушы белок;
- pol – кері транскриптазаны кодтаушы ген;
- env – қабықша белогын кодтаушы ген.



- **Вектор құрастыруға арналған ДНҚ ретровирусының модификациясы**
- ψ^+ - қаптаушы сигнал;
- Neo - селективті маркер;
- P –Neo транскрипциясына арналған вирустық промотор



- Ретровирустық векторды қаптауға арналған «Пакующий» жасушалық линия

- ***Аденовирустық векторлар.***

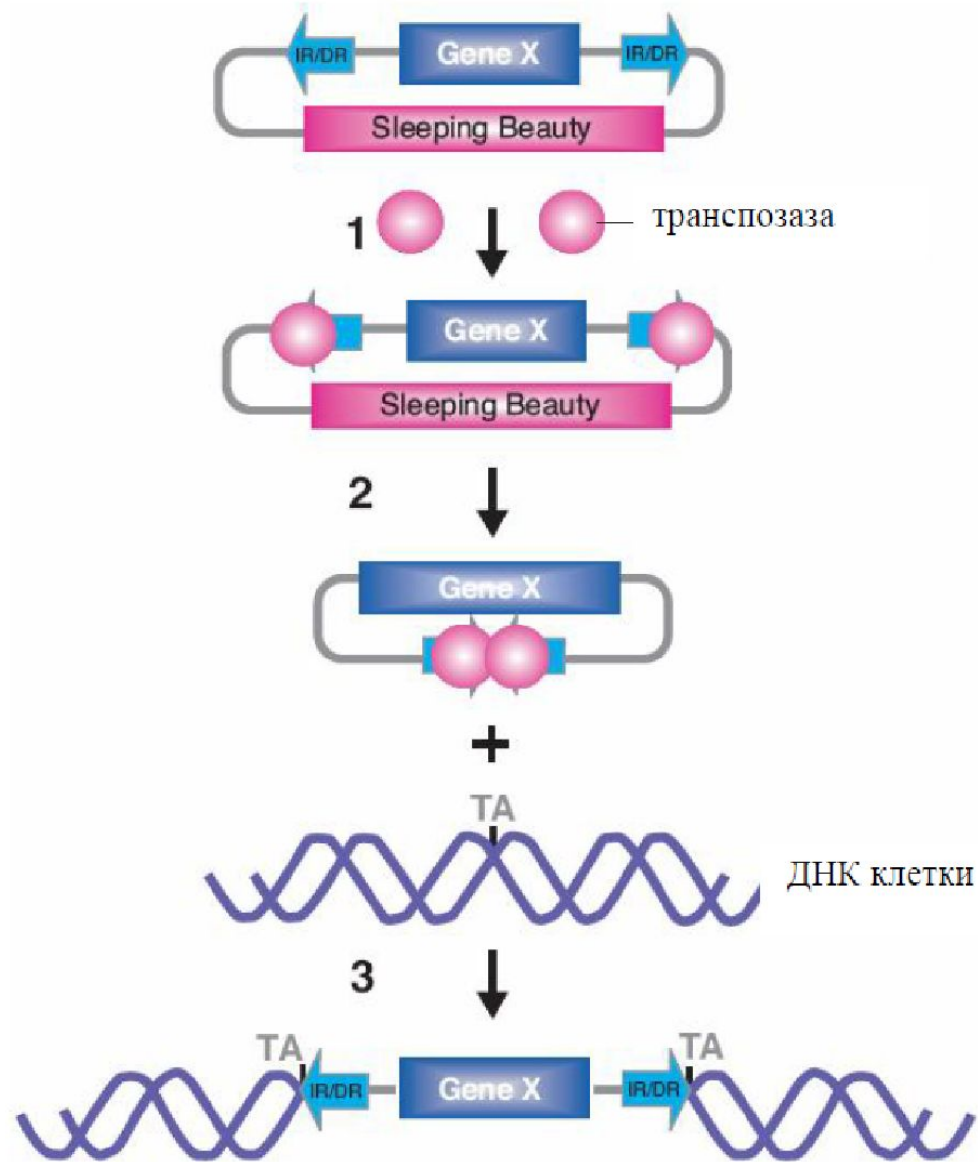
Аденовирустар (сем. Adenoviridae, род Mastadenovirus) – кең тараған ДНҚ-сы бар вирустар, клиникалық көріністің полиморфизмімен сипатталатын ауруларды тудырады.

- Бұл вирустар асқазан-ішек жолы, конъюктивтер, бұлшықет жасушасы, бас ми жасушаларының, жоғары тыныс жолдарының шырышын зақымдауға қабілетті.

ITR	E1A	E1B	E2B	E2A	E3	E4	ITR
-----	-----	-----	-----	-----	----	----	-----

- **Аденовирус геномының құрылыдық ұйымы**
- E1 – трансформацияға арналған критикалық аймақ;
- E1A – транскрипцияны реттеуші;
- E1B – p53 жасушалық белогын байланыстырушы трансформациялаушы антигенді кодтайды;
- E2B – ДНҚ-полимеразаны кодтайды;
- E2A – ДНҚ-байланыстырушы белокты кодтайды;
- E3 – репликацияға қажетті өнімді және I кластағы HLA молекуласымен байланысатын өнімді кодтайды;
- E4 – ядролық матриксмен байланысатын өнімді кодтайды; ITR –100 н.ж. тұратын инверттелген соңғы қайталамалар

- ***Вирустық емес векторлар.
Тасымалдаудың вирустық емес жүйесін
құрастыру үшін мобильдік
элементтердің тізбектері-
транспозондар қолданылуы мүмкін.***
- Бұл мақсат үшін алғаш рет арқан балықтың геномынан бөлініп алынған **транспозон SB (Sleeping Beauty)** қолданылды. Бұл транспозон әртүрлі ағзаның жасушасына оны енгізуге мүмкіндік беретін қожайын жасушасында қандай да бір транспозиция факторының болуын қажет етпейді.



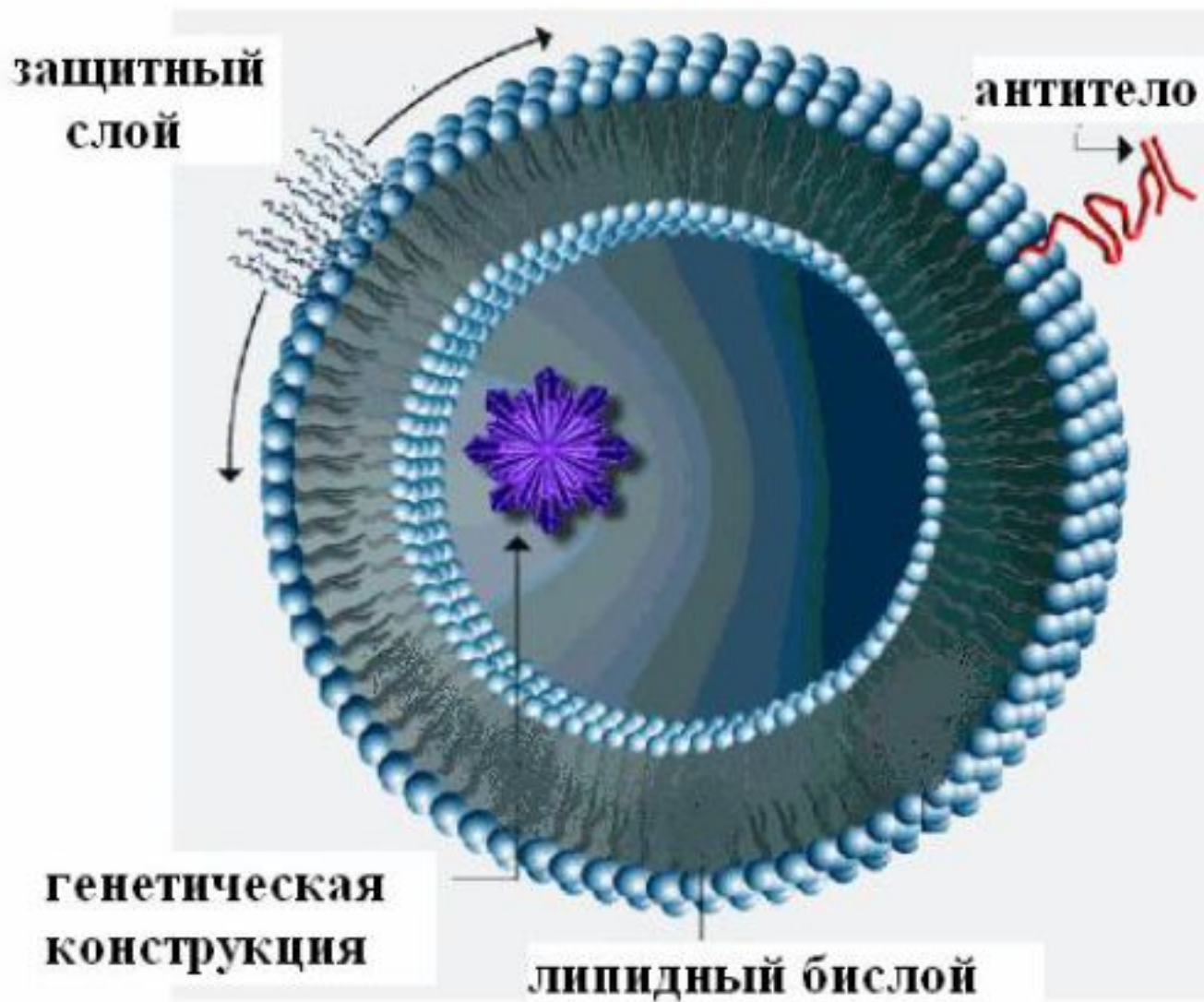
Гендік терапияда транспозонды пайдалану арқылы терапиялық генді жеткізу схемасы

Липосомалардың көмегімен генді тасымалдау

- **Липосомалар** – бір немесе бірнеше биқабатты мембранадан түзілген микроскопиялық фосфолипидтік везикулалар, олар химиялық препараттарды, белоктарды, пептидтерді, ДНҚ, антимағыналы олигонуклеотидтерді тасымалдауға арналған тасымалдаушы құрал болып табылады.

Липосомаларға келесілей қасиеттер тән:

- Биосәйкестік;
- Қосылған заттарды қорғау;
- Гидрофобтық және гидрофильдік қосылыстарды тасымалдау мүмкіндігі;
- Нысана-жасушаның цитоплазмасына қосылыстарды тасымалдау қабілеті.



Иммунолипосома

- ***ДНҚ құрылымды нысана жасушаға трансфекцияның физикалық әдістерінің көмегімен, мысалы электротрансфекцияның көмегімен тура енгізу.***
- Бұл әдіс электропорациямен -жасуша мембранасында поралардың пайда болумен тікелей байланысты.
- Жоғары кернеудегі (0,5-15 кВ/см, жасуша типіне қарай) және әртүрлі ұзындықтағы электр өрісі импульсының жасушаға әсері кішкентай иондар, төмен және жоғары молекулалы заттар үшін плазматикалық мембрананың өткізгіштігінің кері артуына әкеліп соғатындығы анықталды.

- Ұлпаға генетикалық терапиялық құрылымдарды енгізудің басқа физикалық әдісі – «гендік пушканы» қолдану арқылы жүретін трансформацияның баллистикалық әдісі.



Гендік пушка

НЕГАТИВТІ ГЕНОТЕРАПИЯ

- Инфекция немесе ісіктік трансформация кезінде ауру көбіне қалыпты жасушаға тән емес геннің артық қызметінің нәтижесінде туындайды.
- Бұндай жағдайда гендік терапия жоғары активті генді басуға немесе ауру геннің қызметін генетикалық құрылымды жасушаға енгізу арқылы басып тастауға бағытталған.

мРНҚ деңгейінде ген қызметін басып тастау

- ***Антисенс РНҚ терапия.*** мРНҚ деңгейінде геннің жұмысын басып тастайтын құрылымды жасушаға енгізе отырып, *негативтік генді басып тастауға болады.*
- Бұл экспрессияның көмегімен ақау геннің мРНҚ-сына комплементарлы-антисенс РНҚ-ның синтезін қамтамасыз ететін құрылымның жасушасында жүзеге асуы мүмкін.

**Антимағыналы РНҚ арқылы терапия
1978 жылы 13 қалдықтан тұратын
Раус саркомасы вирусының
матрицалық РНҚ-сына
комплементарлы олигонуклеотид
вирустың репликациясын
ингибирлей алатындығы
көрсетілді. Бұндай синтетикалық
РНҚ антимағыналы деп аталынды.**

Рибозимді пайдалану арқылы жүретін гендік терапия

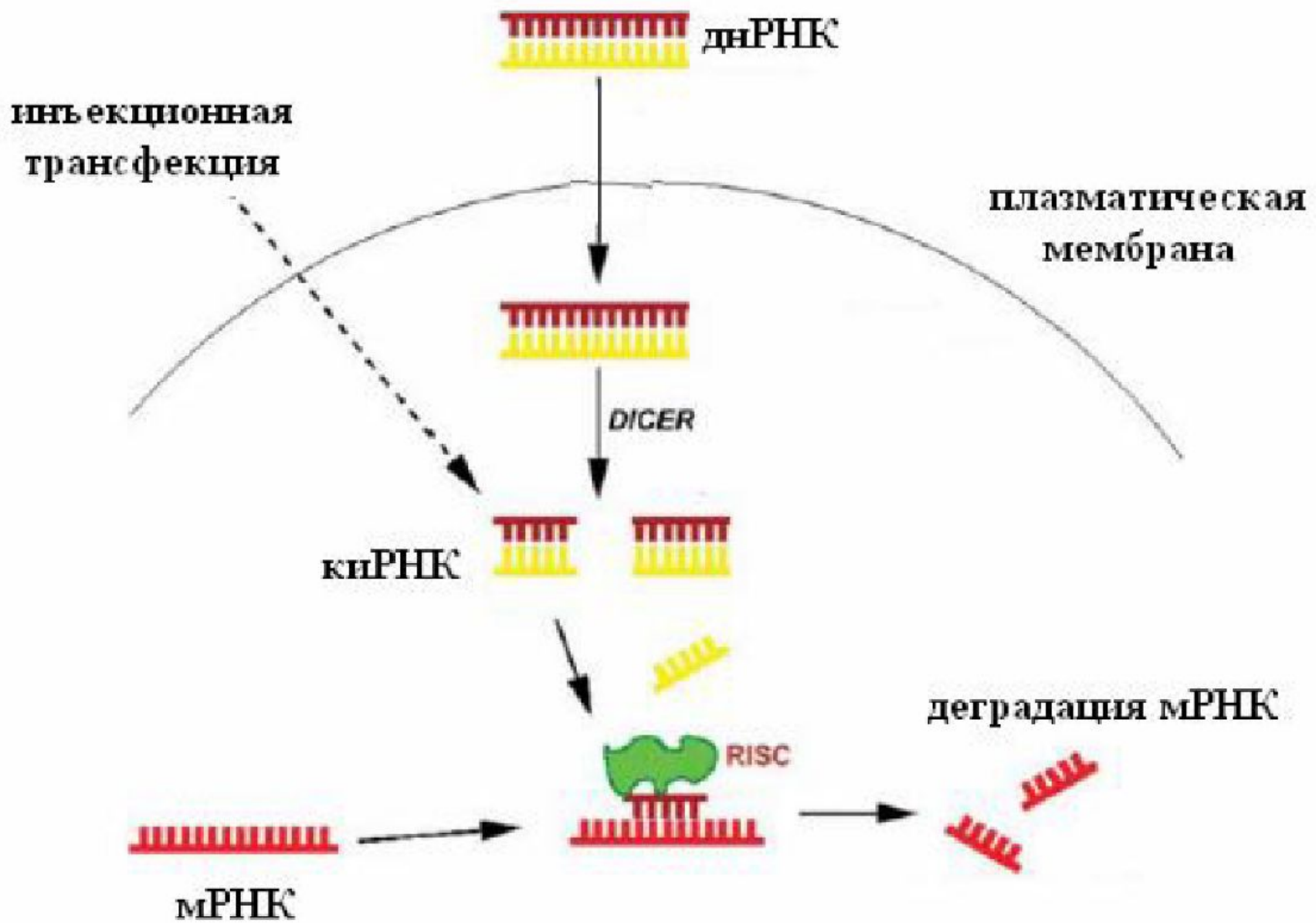
- мРНК деңгейінде ген экспрессиясын басып тастаудың тағы бір әдісі болып ферментативтік қасиетке ие РНК рибозимдерді пайдалану табылады.
- Гендік терапияда рибозимдерді пайдаланудың артықшылығын мынадан байқауымызға болады, яғни антимағыналы РНК-мен салыстырғанда жасушаға сол бір мРНК-ны ыдыратуға бағытталған белгілі бір рибозимді кодтайтын құрылымды енгізу бірнеше рет енгізуді қажет етпейді.

қтРНҚ-ның гендік терапиясы

- мРНҚ деңгейінде негативті генотерапияның басқа әдісі геномға келетін қауіптен және вирустардан қорғау механизмі негізінде құрастырылған.
- Вирустармен зақымдану нәтижесінде жасушада қос тізбекті РНҚ-ның белгілі мөлшері түзіледі (қтРНҚ).
- қтРНҚ гомологиялық рекомбинация нәтижесінде ген экспрессиясының бұғатталуына әкелетін процестерді белсендіреді. Бұл механизм РНҚ интерференция деген атауға ие болды.

қтРНҚ-ның Источником днРНК могут быть:

- Геномы қтРНҚ түріндегі вирустар;
- Геномы бір тізбекті РНҚ түріндегі вирустар, бір тізбекті РНҚ-ның репликациялануының нәтижесінде қтРНҚ түзіледі;
- қтДНҚ- ДНҚ-ның екі әртүрлі тізбегінің транскрипция өнімінің комплементарлы қосылуының нәтижесінде қтРНҚ түзілуі мүмкін.

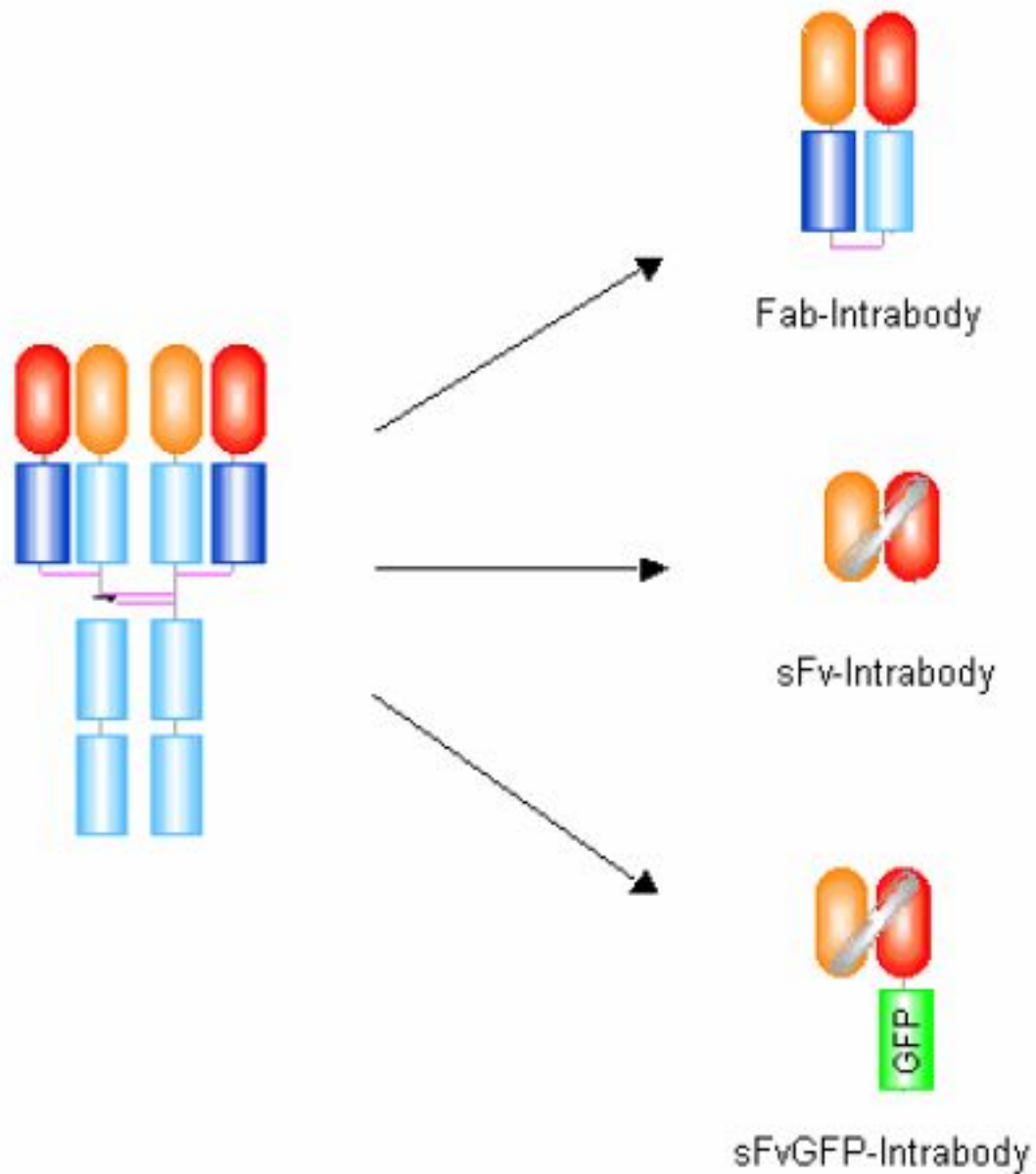


РНҚ интерференция механизмі

Белок деңгейінде ген функциясын басып тастау

Жасушаішілік иммундау.

- Белок деңгейінде ген функциясын басып тастаудың бір әдісі.
- «Жасушаішілік иммундау» терминін нобель лауреаты Дэвид Балтимор ұсынған болатын.
- Жасушаішілік иммундау екі әдіс арқылы жүзеге асуы мүмкін: қажет емес белокты бейтараптауға арналған антиденені экспрессиялаушы генетикалық құрылымды жасушаға енгізу және өзінің антиденесін енгізу.



Бір тізбекті антидене нұсқалары

Гендік түзетуі клиникалық сынақтар (КИ) сатысындағы, эксперименттік талдаулар (ЭР) сатысындағы және қағида түрінде мүмкін (ПВ) тұқым қуалайтын аурулар

Таблица 2. Наследственные заболевания, генокоррекция которых находится на стадии клинических испытаний (КИ), экспериментальных разработок (ЭР) и принципиально возможна (ПВ) [1, 7]

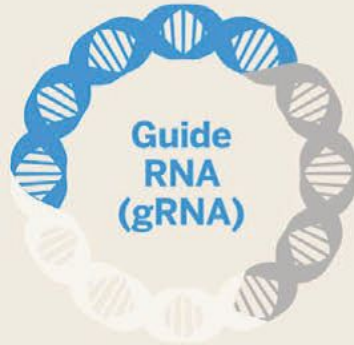
Болезнь	Дефектный ген	Клетки-мишени	Стадия
Иммунодефицит	Аденозиндезаминаза	Лимфоциты	КИ
Иммунодефицит	Пуриннуклеозидфосфорилаза	Лимфоциты	ПВ
Семейная гиперхолестеринемия	Рецептор липопротеинов низкой плотности	Гепатоциты	КИ
Гемофилия В	Фактор IX	Фибробласты	КИ
Гемофилия А	Фактор VIII	Миобласты, фибробласты	ЭР
Болезнь Гоше (сфинголипидоз)	β -Глюкоцереброзидаза	Макрофаги, стволовые клетки	КИ
Болезнь Хантера	Идуронатсульфатаза	Макрофаги, стволовые клетки	ПВ
Синдром Гурлера	L-идуронидаза	Макрофаги, стволовые клетки	ПВ
Эмфизема легких	α -1-Антитрипсин	Лимфоциты	ЭР
Муковисцидоз	CF-трансмембранный регулятор	Эпителий бронхов	КИ
Фенилкетонурия	Фенилаланингидроксилаза	Гепатоциты	ЭР
Гипераммонемия	Орнитинтранскарбамилаза	Гепатоциты	ПВ
Цитрулинемия	Аргиносукцинатсинтетаз	Гепатоциты	ПВ
Мышечная дистрофия Дюшенна	Дистрофин	Миобласты, миофибриллы	ЭР
Талассемия	β -Глобин	Эритробласты	ЭР
Серповидноклеточная анемия	β -Глобин	Эритробласты	ЭР
Респираторный дистресс-синдром	Сурфактант белок В	Эпителий бронхов	ЭР
Хронический грануломатоз	NADPH-оксидаза	Гранулоциты	ЭР
Болезнь Альцгеймера	Белок – предшественник β -амилоида (A β)	Нервные клетки	ЭР
Болезнь Паркинсона	Тирозингидроксилаза	Миобласты, фибробласты, нервные клетки	ЭР
Метахроматическая лейкодистрофия	Арилсульфатаза А	Стволовые клетки крови, нервные клетки	ПВ
Синдром Леш-Нихана	Гипоксантинфосфорибозилтрансфераза	Нервные клетки	ПВ

3 кесте Онкологиялық ауруларды гендік түзетудегі негізгі әдістер

Принцип	Енгізілген гендер
<p>Ісіктің иммунореактивтілігін арттыру</p> <p>Иммундық жасушалардың генетикалық модификациясы «Сезімтал» гендер немесе «өзін өзі өлтіретін» гендер инсерциясы Онкоген экспрессиясының бұғаты</p> <p>Ісік супрессор-гендерінің инсерциясы Химиятерапиядан қалыпты жасушаларды қорғау Қалыпты жасушалар арқылы ісікке қарсы заттар синтезінің индукциясы Ісікке қарсы рекомбинантты вакцина өнімдері Антиоксиданттардың көмегімен қалыпты ұлпаның локальды радиопротекциясы</p>	<p>Цитокиндердің, бөтен антигендердің гендері</p> <p>Цитокиндердің, костимуляторлардың гендері</p> <p>HSV тимидинкиназа, цитозин дезаминаза гендері</p> <p>Антимағыналы Ki-ras мРНҚ, жасушаішілік антидене гендері P53 1 типтегі дәріге төзімді гендер Интерлейкин-2, интерферон гендері</p> <p>Ісік антигенін экспрессиялаушы БЦЖ типіндегі вакцина Трансфераза, глутатион синтетаза гендері</p>

CRISPR-Cas9

How the genome editor works



1
A cell is transfected with a DNA plasmid that expresses both the Cas9 protein and a sequence of guide RNA (gRNA), which matches that of the gene of interest.

gRNA

2
Cas9 identifies the corresponding DNA sequence on the host cell's genome, and cuts both strands of DNA.

Cas9

Cas9 cuts both the DNA strand to which the gRNA binds and the opposite strand

PAM sequence
(see below right)



3a

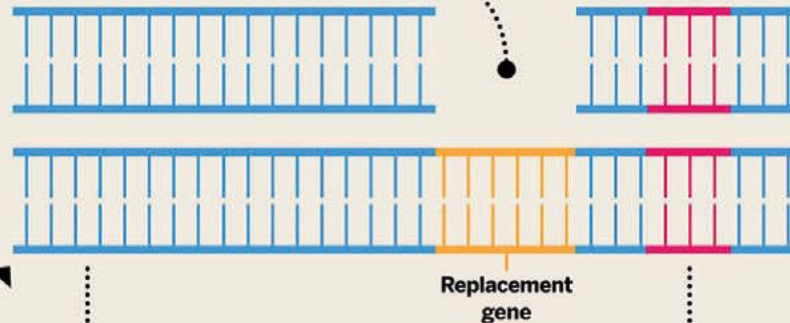
The cell's attempt to repair the break effectively **silences the targeted gene** by joining the cleaved DNA back together, using a process called non-homologous end joining (NHEJ).

OR

3b

A **faulty gene can be 'corrected'** with a replacement segment of DNA, or **a new gene altogether can be introduced**. If a modified piece of DNA whose flanking regions match the target sequence is also supplied, then there is a good chance that it will recombine with the host DNA when the cut is made, thus introducing a new or replacement gene. This pathway is known as homology directed repair (HDR).

Double strand break in target DNA



Cas9 requires a simple and common sequence of base pairs called a **PAM sequence** to actually bind to target DNA. This feature means bacteria can prevent Cas9 from chopping up important 'memorised' sequences of foreign DNA in their own genome – by ensuring there are no PAM sequences in those regions.

What next?



FOOD AND LIVESTOCK MODIFICATION

Researchers have already created plants and mammals with edited genomes. It is hoped such technology could help boost productivity and improve food security.



GENE DRIVE

Some genes are more likely to be passed on than others. If an 'edit' is linked to these genes, it will quickly spread through a wild population. That sounds alarming, but could help eradicate malaria-carrying mosquitos.



GENE THERAPY

Genetic disease could be treated by introducing gene editing systems into affected cells. Researchers in the USA are trialling this to treat HIV by knocking out the gene for the specific T-cell receptor that the virus targets.



HUMAN GERM LINE

Modifying human embryos, sperm or eggs would introduce changes to the genome of future generations. Some argue that other techniques, such as embryo screening, can just as effectively prevent genetic disease.



DESIGNER ORGANISMS AND MORE...

In future, could babies be 'designed' with a genome of our choosing? Could amateur biologists do their own gene editing outside regulatory systems?

Көңіл бөлгендеріңізге рахмет!