

генной

инженерии.

Использование

вирусов в

качестве

---

векторов

(вопрос 95).

# Что такое генная инженерия?

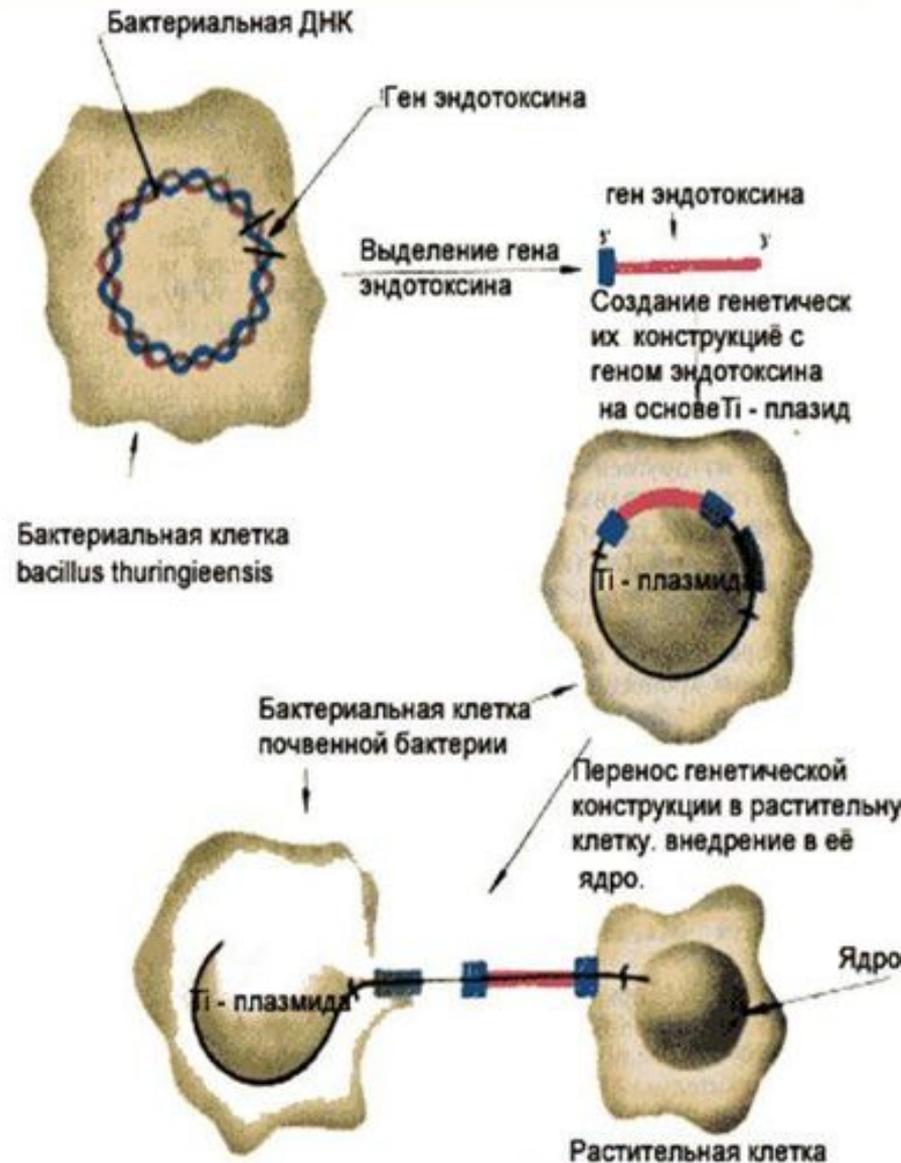


Генетическая инженерия (генная инженерия) — совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами, введения их в другие организмы и выращивания искусственных организмов после удаления выбранных генов из ДНК.

Генетическая инженерия не является наукой в широком смысле, но является инструментом биотехнологии, используя методы таких биологических наук, как молекулярная и клеточная биология, генетика, микробиология, вирусология.

# Основные этапы создания трансгенных клеток и организмов

1. Получение изолированного гена
2. Введение гена в вектор для переноса в организм.
3. Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.
4. Преобразование клеток организма.
5. Отбор генетически модифицированных организмов и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.



# Ферменты генетической инженерии

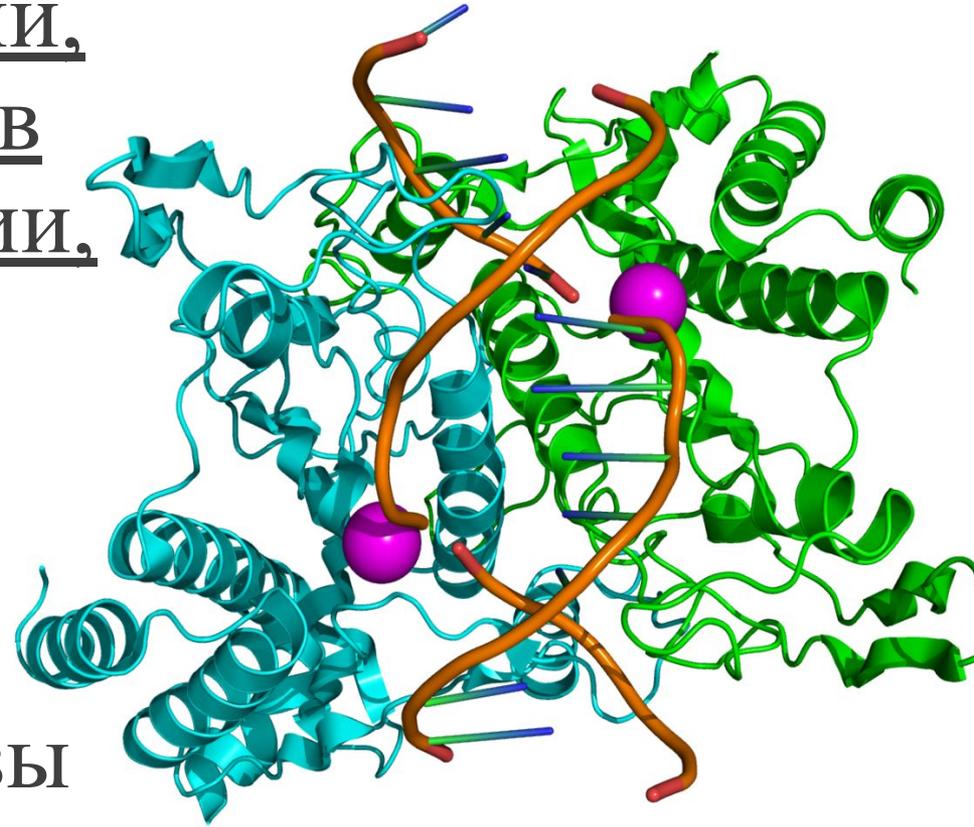
Основными ферментами, которые используются в генетической инженерии, являются:

рестриктазы

лигазы

ДНК- полимеразы

обратные транскриптазы  
(ревертазы)



# Достижения и перспективы генетической инженерии

---

1. Генетическая инженерия микроорганизмов;
2. Генетическая инженерия растений;
3. Генетическая инженерия животных;
4. Генная терапия.

# Генная инженерия микроорганизмов



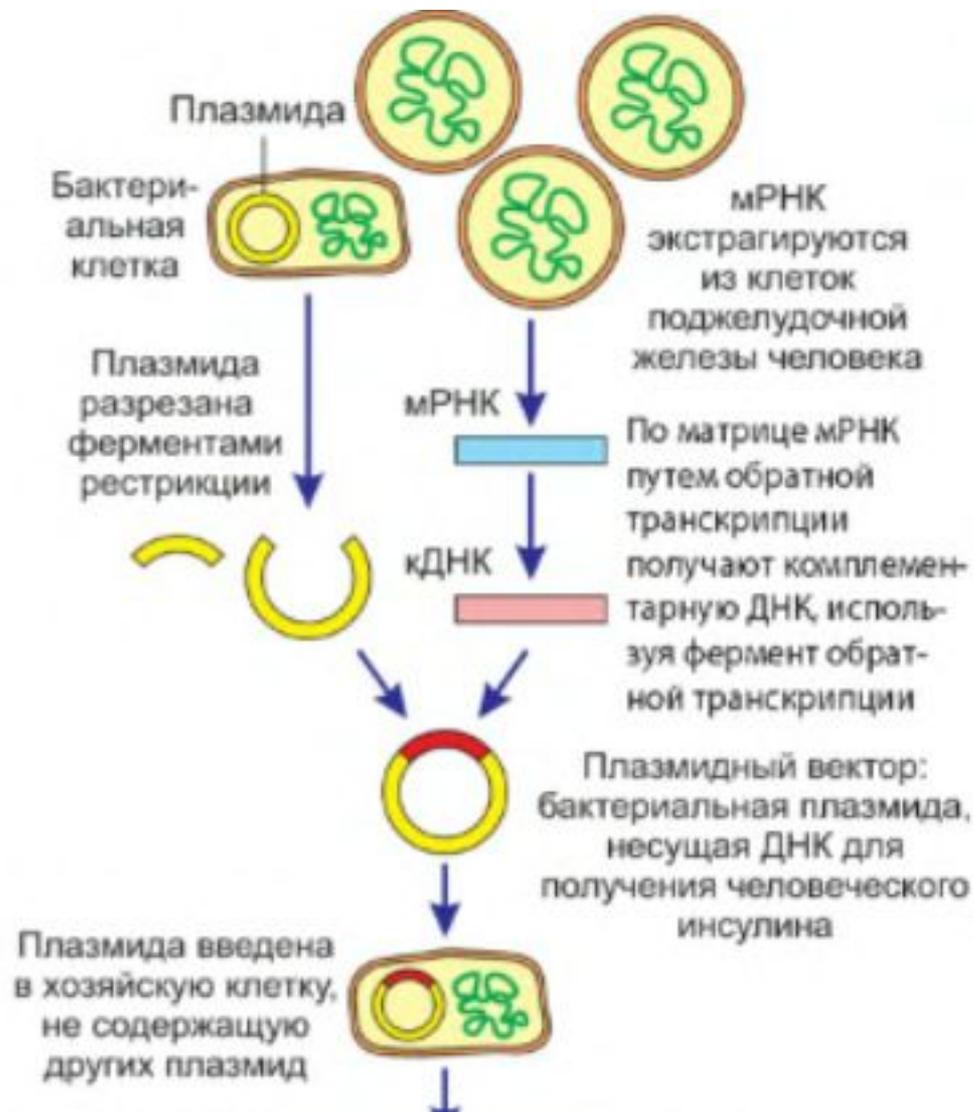
*А. Чакрабартти*

1980 г. – начало промышленной генной инженерии микроорганизмов. Выдан первый патент на генно-инженерный штамм микроорганизма, способный разлагать нефть.

# Получение генно-инженерного инсулина



Еще через 2 года был разрешен для клинического использования полученный из бактерии 1-й лекарственный препарат – человеческий инсулин.



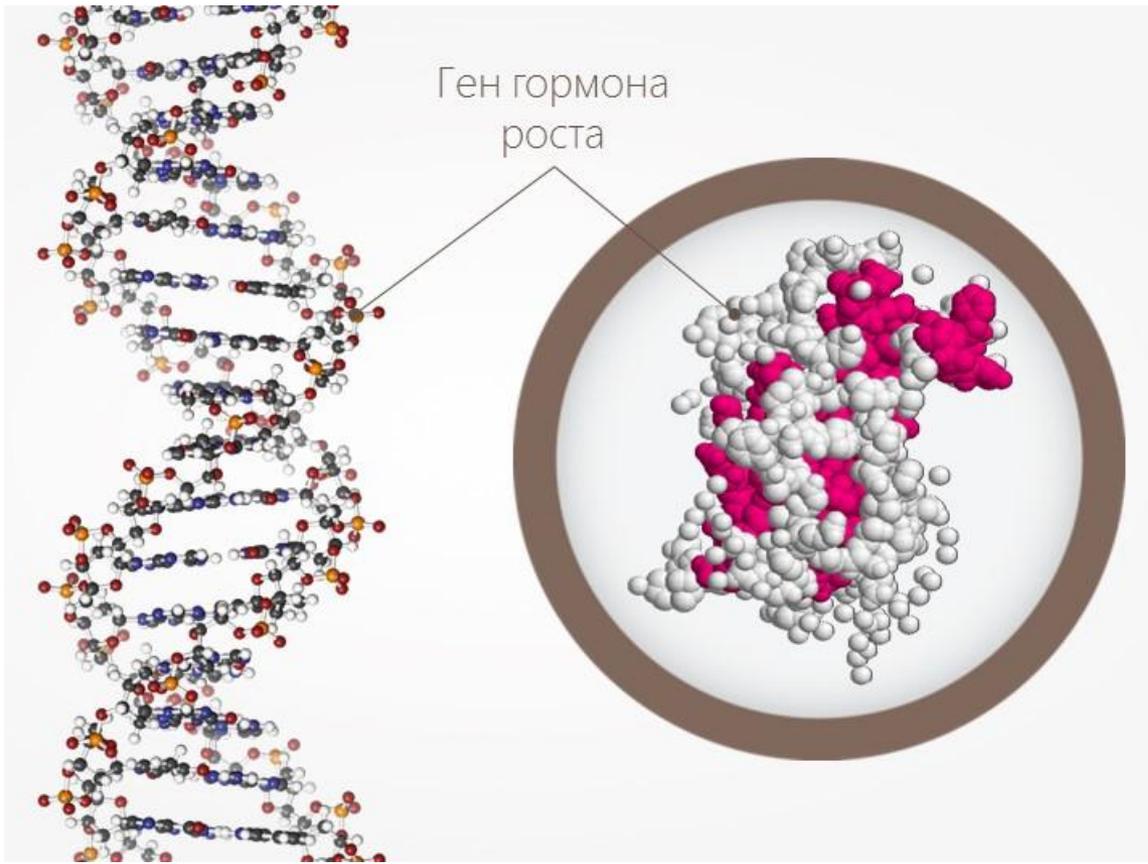


**Ю. А. Овчинников**



**В. Г. Дебабов**

В нашей стране Ю. А. Овчинников и В. Г. Дебабов с сотрудниками получили микроорганизмы, эффективно синтезирующие интерферон человека (до 5 мг интерферона на 1 л суспензии бактерий, что в 5000 раз больше, чем содержится в 1 л крови доноров).



Получение бактерии *E. coli* со встроенным геном соматотропина – гормона роста человека, который используется не только в медицинских целях, но и в практическом животноводстве, повышая с его помощью интенсивность роста животных.

# Генная терапия

Генная терапия – это устранение генетических дефектов (коррекция наследственных патологий) путем введения в соматические клетки полноценных (функционально активных) генов вместо (или помимо) поврежденного (мутантного) гена.

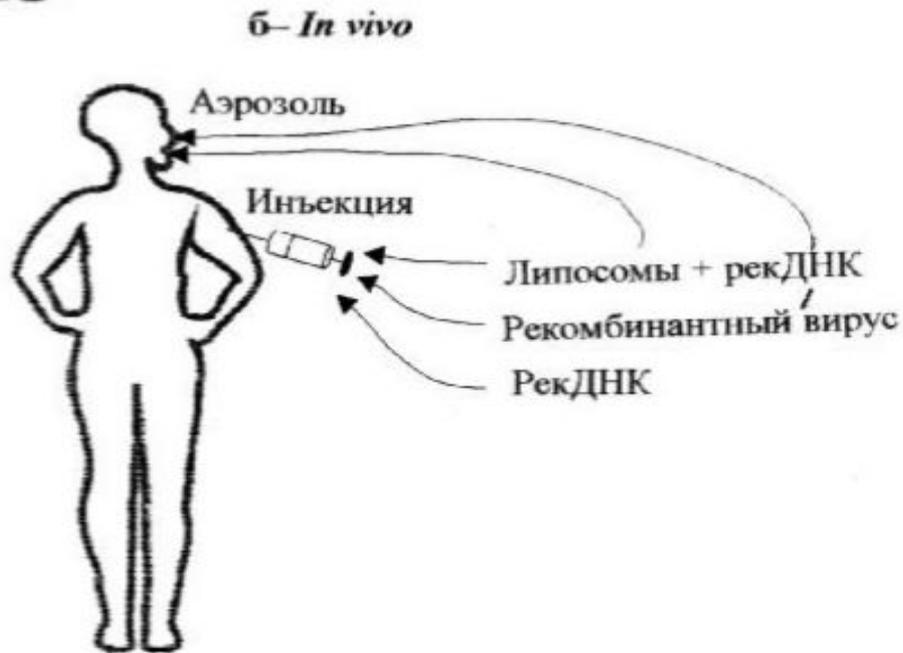
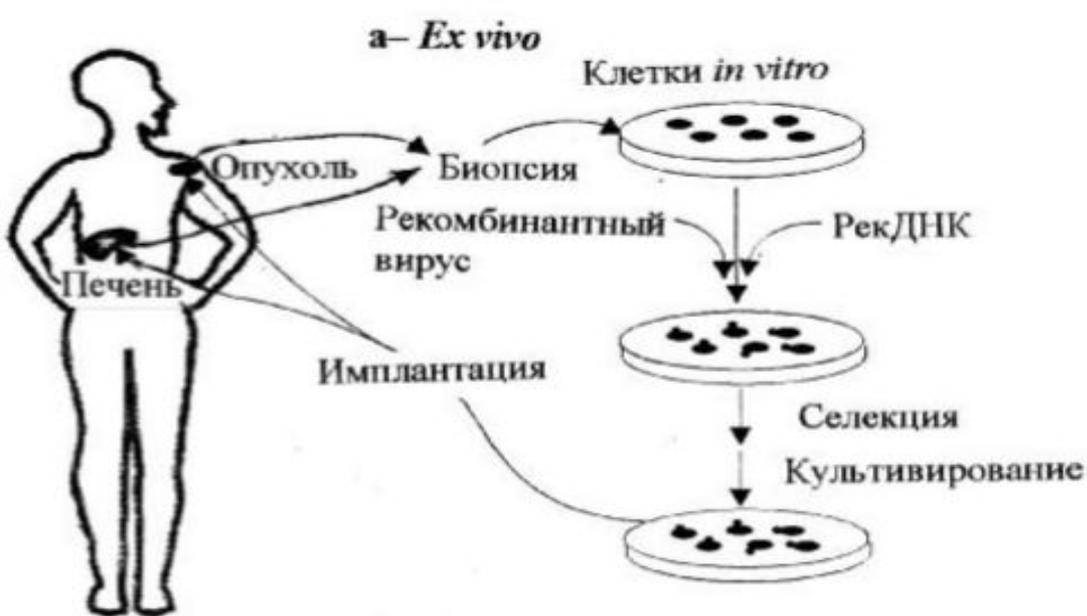


# Вирусные векторы

---

Вирусные векторы — это инструменты, обычно используемые молекулярными биологами для доставки генетического материала в клетки. Этот процесс может выполняться внутри живого организма (*in vivo*) или в культуре клеток (*in vitro*). Вирусы разработали специализированные молекулярные механизмы для эффективного транспорта своих геномов внутри клеток, которые они заражают. Доставка генов или другого генетического материала вектором называется трансдукцией, а инфицированные клетки описываются как трансдуцированные. Молекулярные биологи впервые использовали этот механизм в 1970-х годах. Пол Берг использовал модифицированный вирус SV40, содержащий ДНК бактериофага  $\lambda$  для заражения клеток почки обезьяны, содержащихся в культуре.

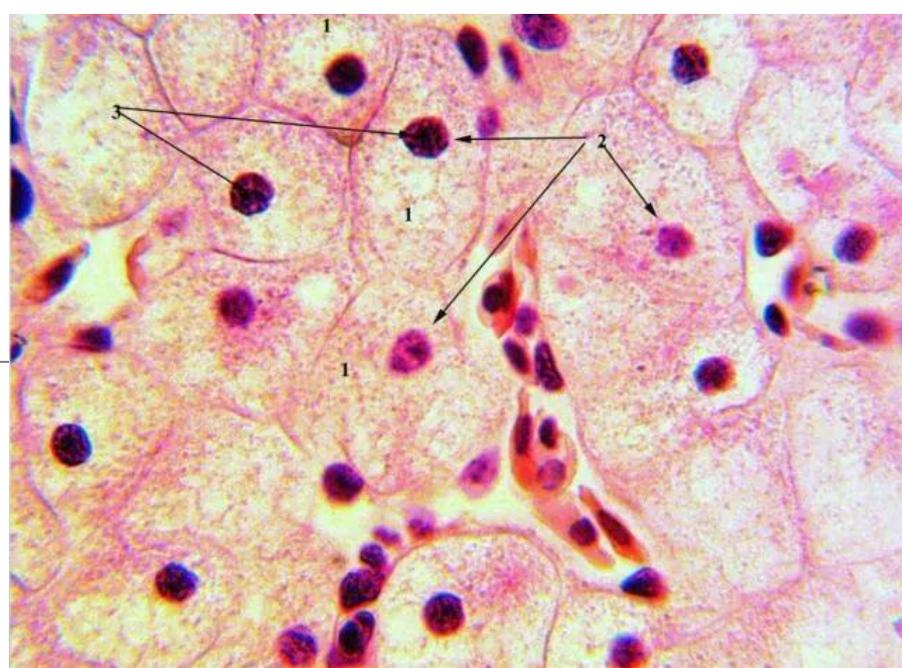
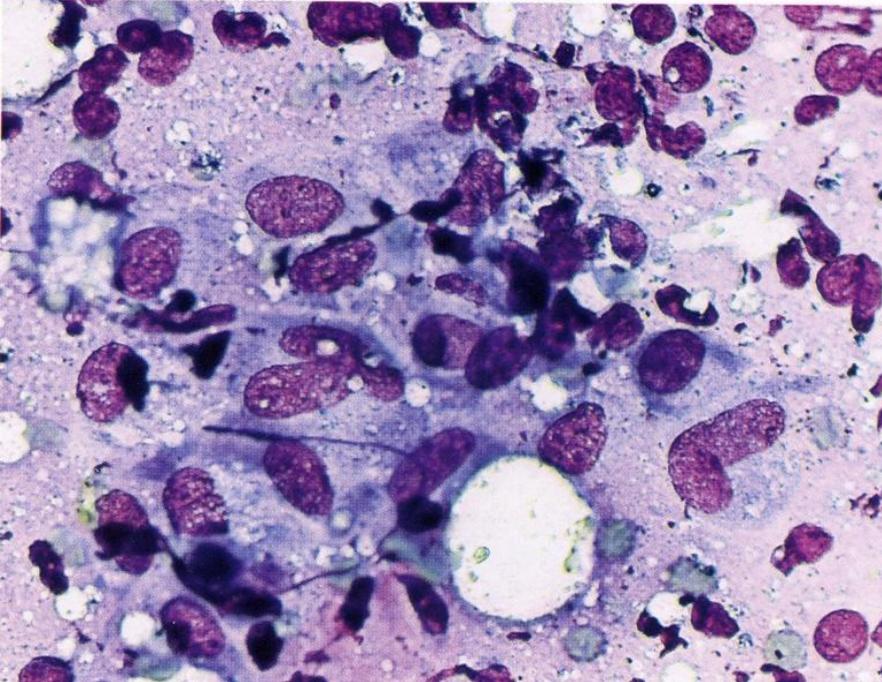
Помимо их использования в исследованиях молекулярной биологии, вирусные векторы используются для генной терапии и разработки вакцин.



# Методы генной терапии

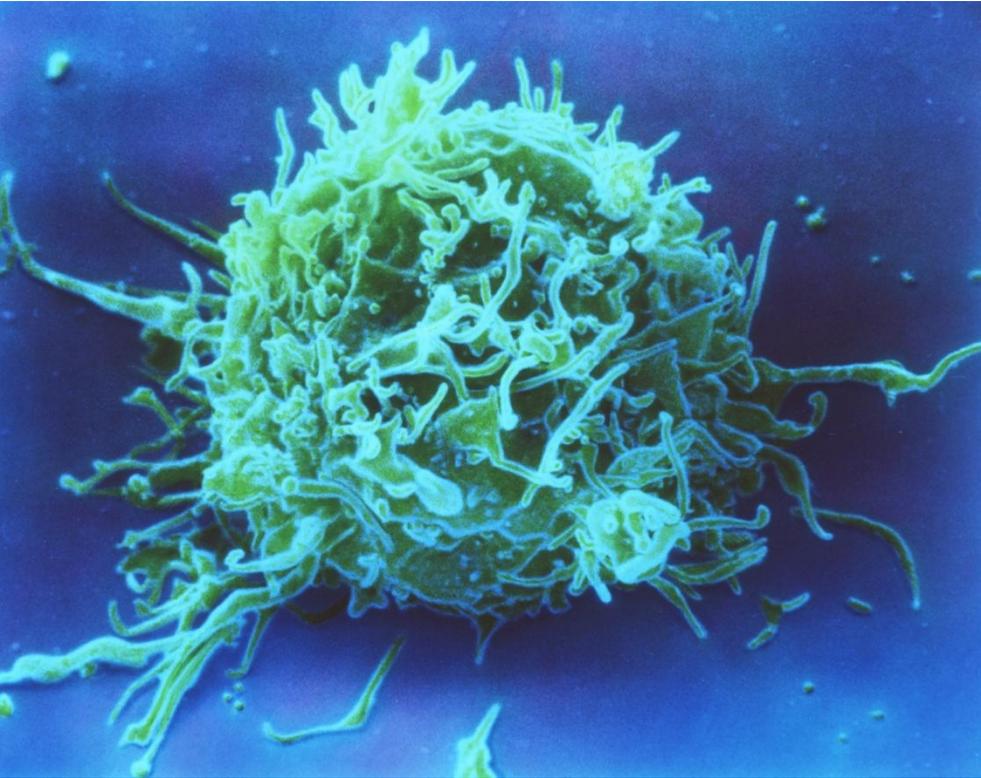
Две стратегии генотерапии: введение терапевтических генов в клетки-мишени вне организма (а) или внутри организма (б)

[Рыбчин, 1999]



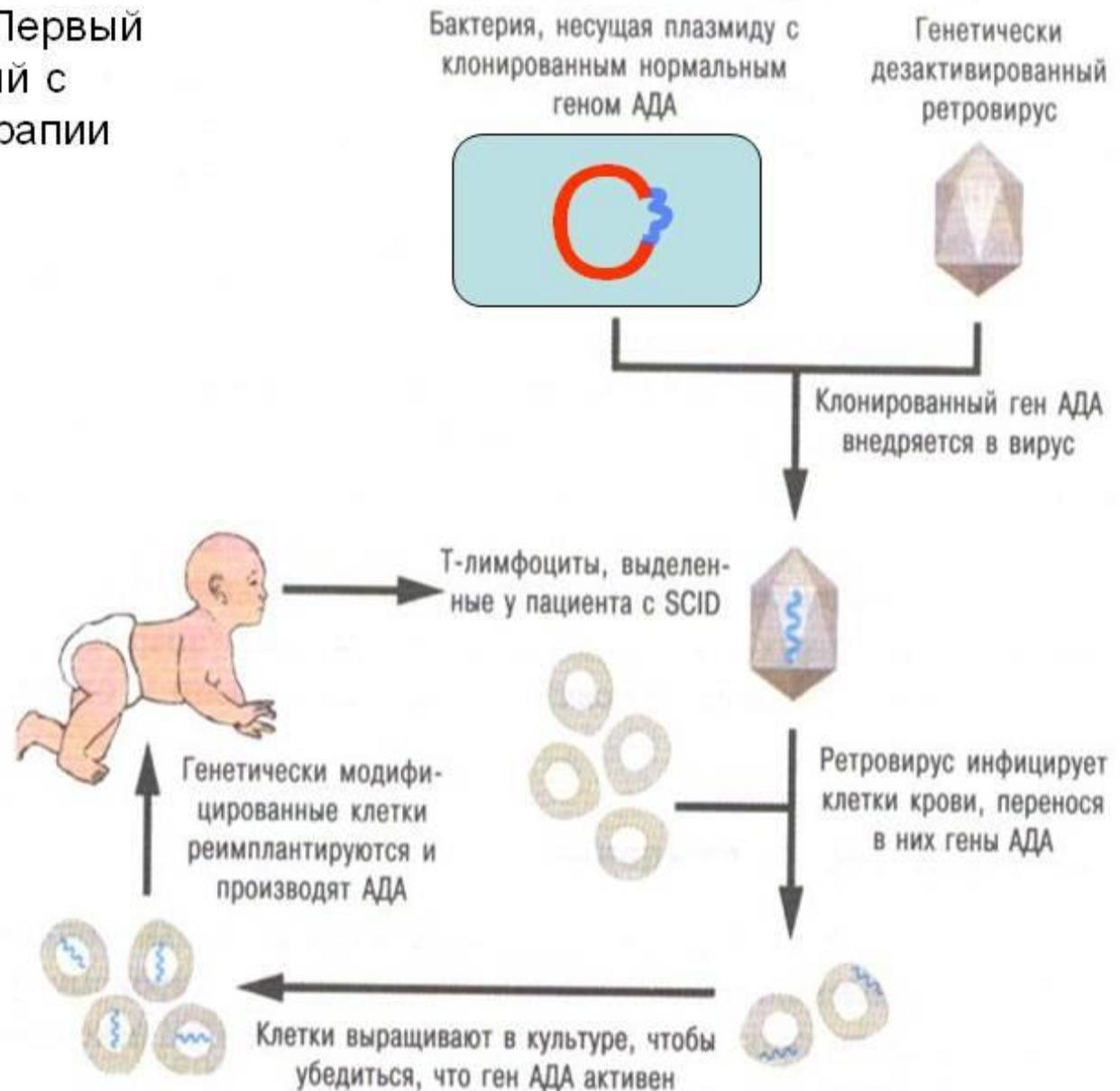
Для переноса генов чаще всего используют относительно легко доступные клетки: фибробласты, лимфоциты, клетки печени-гепатоциты, кератиноциты, эндотелиальные и мышечные клетки, стволовые клетки костного мозга. Такие клетки можно извлечь из организма, включить в них нужную генную конструкцию, провести отбор и культивирование *in vitro* трансформированных клеток, а затем вновь ввести их (реимплантировать) в организм больного. При этом у реципиента не развивается нежелательного иммунного ответа, но сама процедура является весьма дорогостоящей и трудоемкой.

# Достижения



Первая успешная попытка применить генотерапию в клинической практике была предпринята в 1990 году в США для излечения у 4-летнего ребенка иммунодефицита, обусловленного мутацией в гене аденозиндезаминазы (ген ADA).

Ашани Де-Сильва. Первый человек, вылеченный с помощью генной терапии



**Схема генной терапии тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID), вызванного дефектом гена аденозиндезаминазы (АДА)**

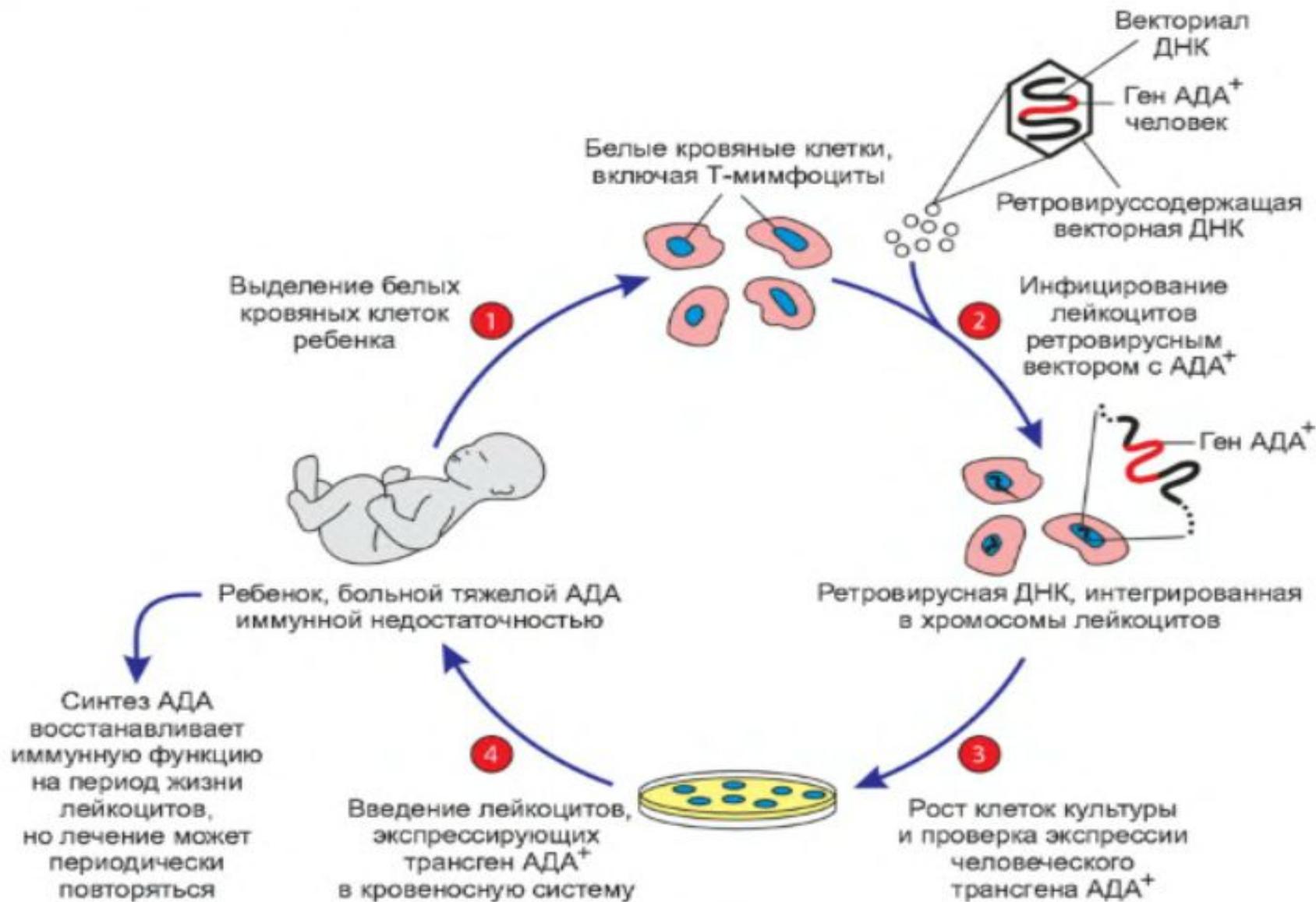
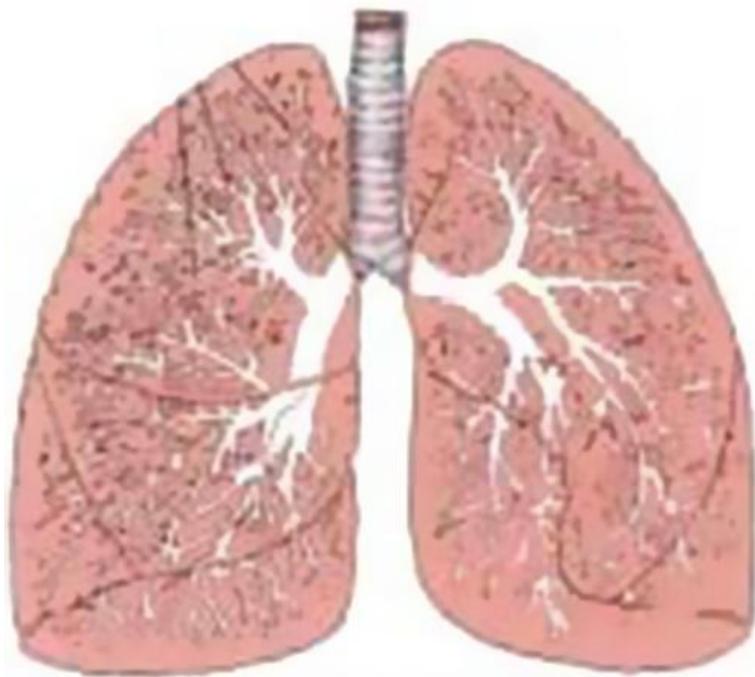


Рис. 4.68. Принцип генной терапии. Лечение тяжелой иммунной недостаточности

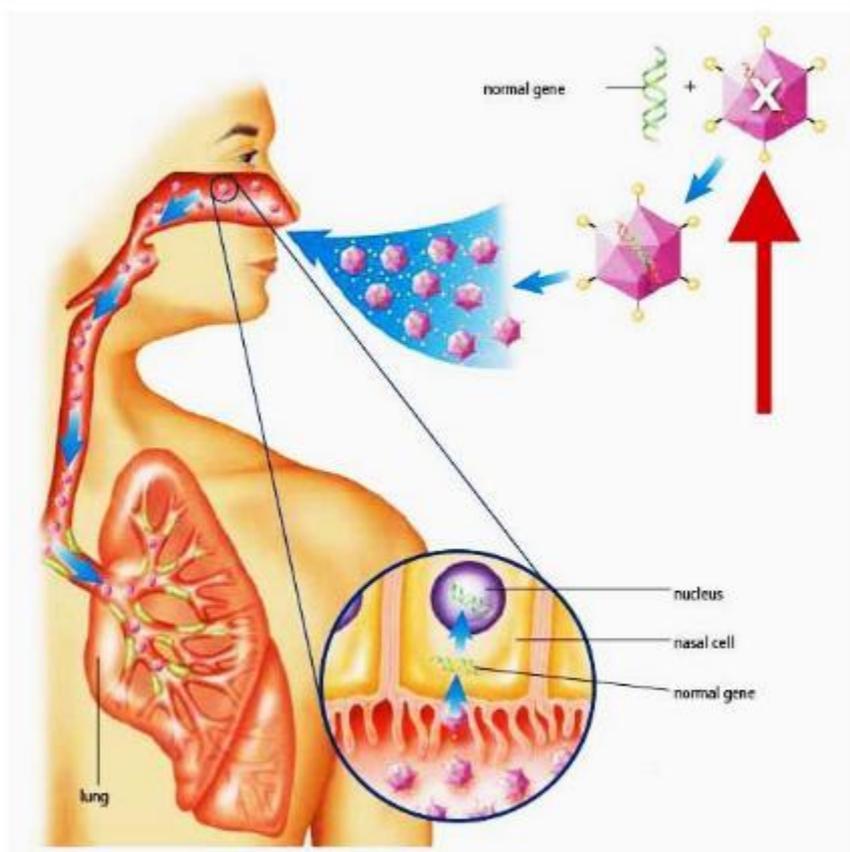


**Здоровые легкие**



**Муковисцидоз**

Ряд исследователей в разных странах полагают, что сегодня наиболее реальна генотерапия муковисцидоза. Это тяжелое, рецессивно наследуемое заболевание (поражающее в странах Европы одного из 2500 новорожденных), обусловленное дефектами в гене CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator), которые приводят к поражению экзокринных желез и проявляются чаще всего в виде бронхолегочных изменений. В протоках некоторых органов (особенно в легких и поджелудочной железе) скапливается слизь. Она становится источником бактериальной инфекции, которая с трудом поддается лечению антибиотиками.



**Схема доставки нормальной копии гена CFTR при генной терапии легочной формы муковисцидоза**

Например, для лечения легочной формы муковисцидоза лечебный ген, включенный в липосомы, вводят в дыхательные пути в форме аэрозоля. Однако до клинических испытаний предстоит еще решить непростые вопросы взаимодействия генетических препаратов с клетками, устойчивости эффекта и т.д.

В настоящее время успешно разрабатываются, в том числе и в нашей стране, генно-инженерные подходы лечения мышечной дистрофии Дюшенна. Это заболевание, сцепленное с X-хромосомой, приводит к ранней инвалидности и летальному исходу в возрасте до 20 лет одного из каждых 3500 новорожденных мальчиков.

*Норма*



*Дистрофия*

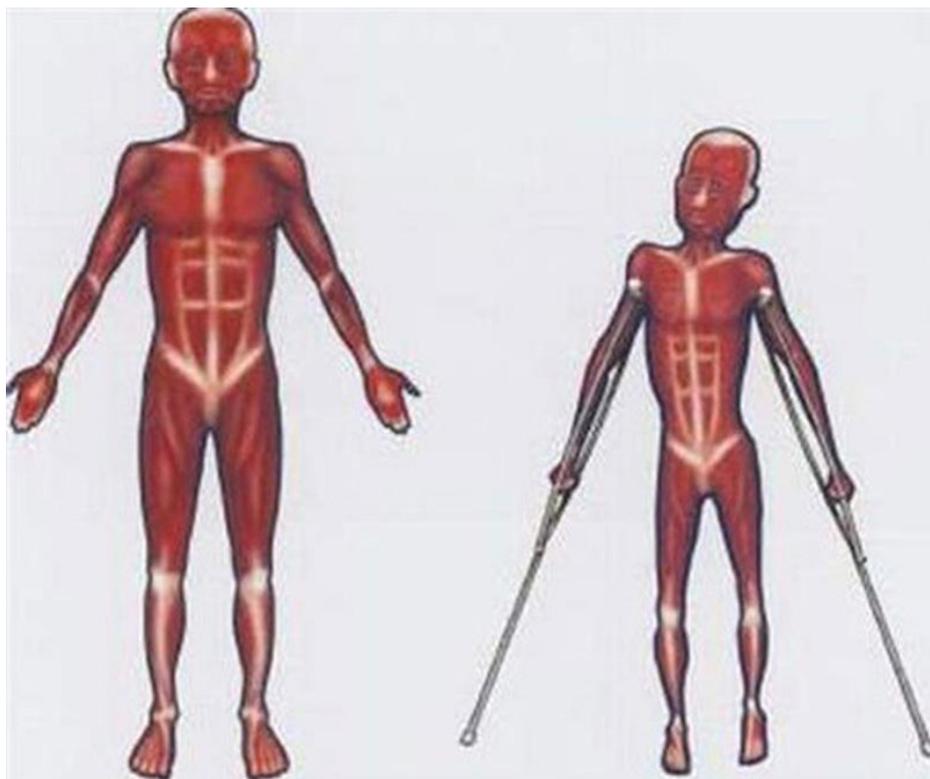


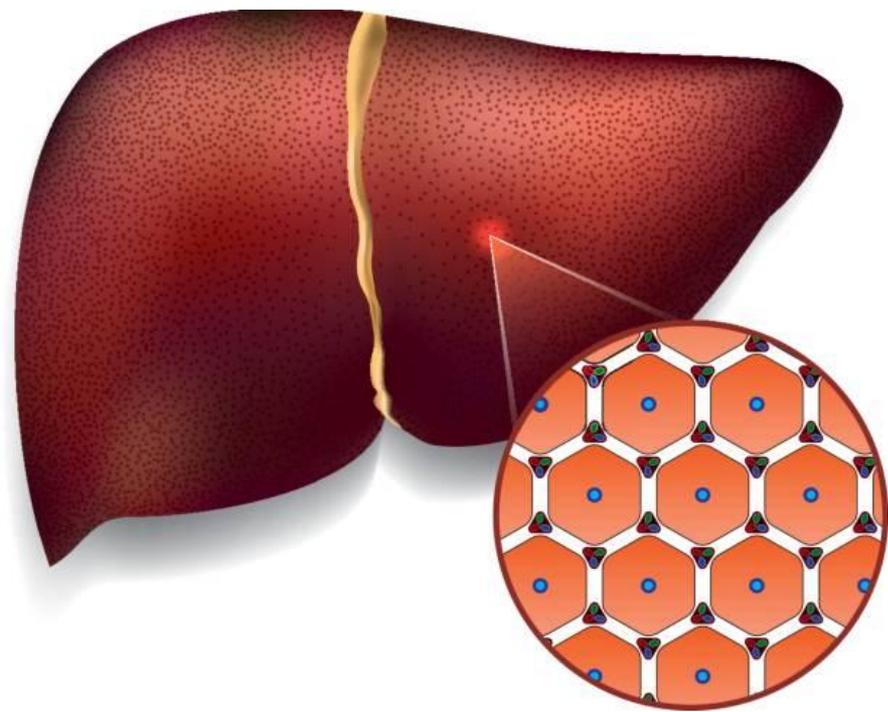
---

Один из возможных подходов к терапии этой болезни – восстановление экспрессии дистрофина путем трансплантации миобластов в мышцы.

Описан положительный терапевтический эффект, когда мальчику в возрасте 6-14 лет имеющим это заболевание, трансплантировали в мышцы нормальные миобласты, взятые от братьев или отца и выращенные в культуре до нужного количества

Другой генно-инженерный подход лечения мышечной дистрофии Дюшенна – ген дистрофина вводят непосредственно в скелетные мышцы с мышечной дистрофией путем инъекции. Процедура должна неоднократно повторяться. Векторная ДНК попадает в кровь и разносится по всему организму. В опытах на мышах показано, что увеличение количества гена дистрофина происходило не только в скелетных мышцах, но также в диафрагме и в сердце, поражение которых – одна из частых причин смерти. Ген дистрофина экспрессируется и оказывает терапевтический эффект.





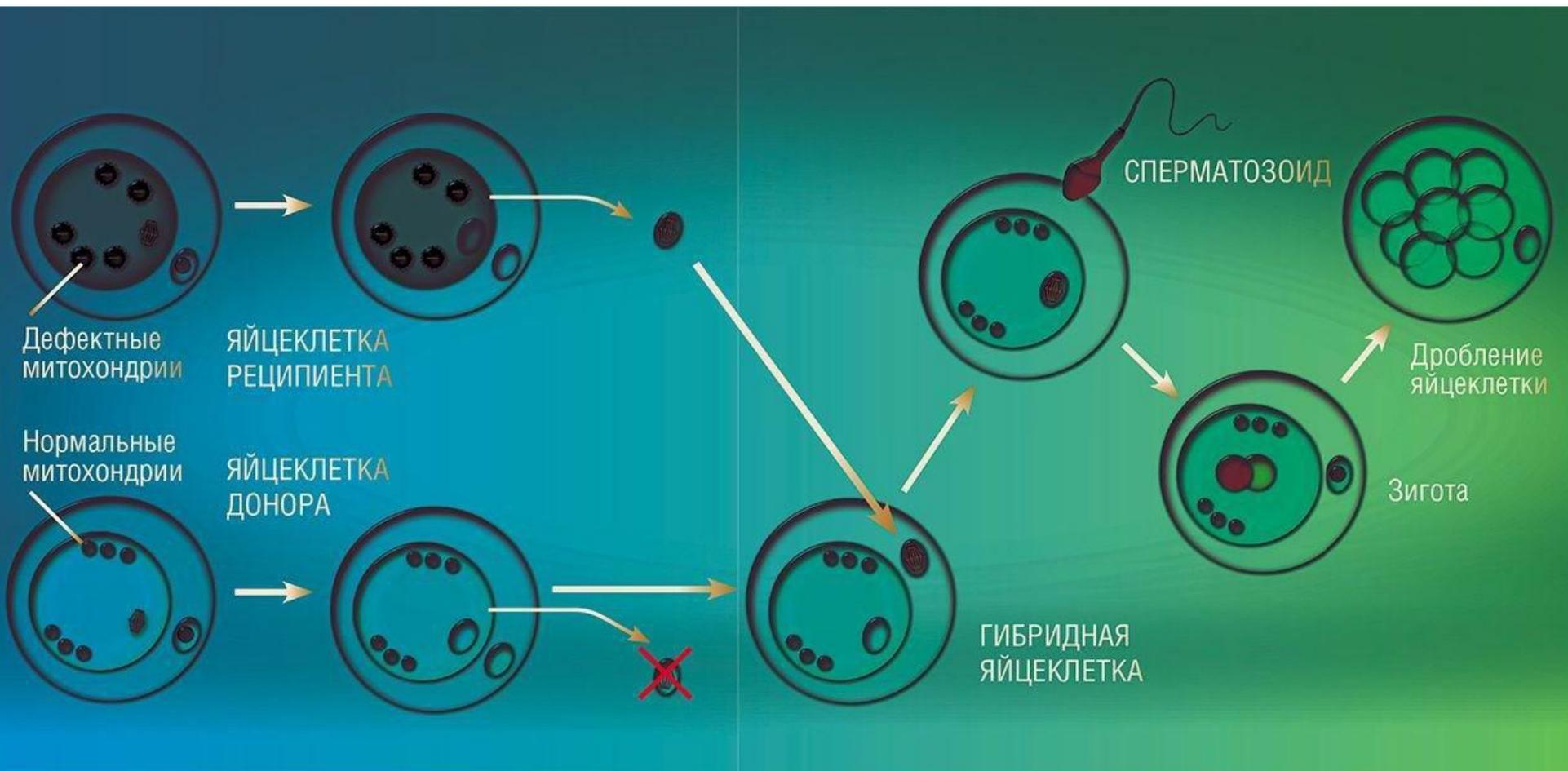
При лечении «семейной гиперхолестеринемии», обусловленной мутацией белка рецептора, который в клетках печени должен связывать частицу, переносящую холестерин в плазме крови, у больного отсекают 200-300 г печени. Гепатоциты (клетки печени) культивируют и подвергают трансформации в лабораторных условиях. В них вводят нормальный ген, используя в качестве вектора аденовирус или путем бомбардировки клеток из специальной «генной пушки» золотыми пульками, т.е. частицами золота с нанесенными на них фрагментами ДНК, включающими лечебный ген.

В СМИ 2001 г. появились сенсационные сообщения о рождении в США первых генетически модифицированных детей. Генно-инженерный подход использован для преодоления врожденного бесплодия женщин, вызванного дефектом митохондрий.

---



Генетически модифицированные дети появились у обреченных на бесплодие матерей благодаря переносу в их яйцеклетки ДНК недефектных митохондрий.



# Опасности генетической инженерии

---

1. В результате искусственного добавления чужеродного гена непредвиденно могут образоваться опасные вещества.
2. Могут возникать новые и опасные вирусы
3. Знания о действии на окружающую среду модифицированных с помощью генной инженерии организмов, привнесенных туда, совершенно недостаточны.
4. Не существует совершенно надежных методов проверки на безвредность.
5. В настоящее время генная инженерия технически несовершенна, так как она не в состоянии управлять процессом встраивания гена, поэтому невозможно предсказать результаты.



СПАСИБО ЗА  
ВНИМАНИЕ!

