



ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА КАФЕДРАСЫ

ДӘРІС 10. ГЕНДІК ТЕРАПИЯ

Лектор: PhD, қауымдастырылған
профессор Тайпақова С.М.

Жоспар:

- **Тұқым қуалайтын аурулар**
- **Ген терапиясының түрлері**
- **Гендік инженерия әдістерінің ген терапиясында қолданысы**
- **Вирустық векторлар көмегімен гендік терапия принципі**

Тұқым қуалайтын аурулар - ата-аналарынан ұрпақтарына берілетін аурулар.

Тұқым қуалайтын аурулар **гендік, хромосомалық және геномдық** мутациялардың әсерінен генетикалық материалдың өзгеруіне байланысты қалыптасады.

Гендік немесе нүктелік мутация - ген құрылымы шегіндегі өзгерістер. Бұл белок молекуласын өзгерте алады.

1. **Оқылу шегінің ығысуы**-нуклеотидтер санының өзгеруі
2. **Инверсия** - гендегі нуклеотидтердің орналасу ретінің өзгеруі.
3. **Негіздердің алмасуы**- нуклеотидтің алмасуына байланысты өзгеру. Транзиция, трансверсия

Хромосомалық аберрация - хромосома құрылымындағы өзгерістер. Бүтін хромосоманың мөлшері мен пішінін өзгерте алады.

1. **Делеция** - Хромосоманың қандай болса да бір үлескісінің жоғалуы. Мысалы: АВГЕ - қос делеция, Б және Д үзіктерінің шығып калуы.
2. **Дупликация** - үлескінің еселенуі. Мысалы: АББВГДЕ.
3. **Инверсия** - үлескінің 180°-қа төңкеруі. Мысалы: АДГВБЕ.
4. **Транслокация** - сәйкес емес екі хромосомалар арасындағы үлескілердің алмасуы. Мысалы: АЕСУЛЕ.

Геномдық мутация - хромосома санының өзгеруі, яғни құрам санының ауытқуы.

1. **Анеуплодия** - бір немесе бірнеше хромосомаларды жоғалту немесе қосып алу. $2n+(1-2)$.
2. **Гаплоидия** - қалыпты хромосома жиынтығының 2 есе кемуі. $1n$.

Мутация пайда болған жасушаның түріне қарай *гаметалық, соматикалық* болып ажыратылады.

Гаметалық мутация жыныстық жасушаларда болады, ол толық өзгерген организмнің дамуына әкеледі және ұрпақтан ұрпаққа беріледі.

Соматикалық мутация дененің кейбір жасушаларында болады және ол ұрпақтан ұрпаққа берілмейді. Модификацияланған клеткаларды макрофагтар мен Т-лимфоциттер жойып отырады.

Сонымен қатар, өздігінен дамиды *спонтандық* және белгілі бір түрткілерден дамиды *бағытталған* мутацияларды ажыратады.

Спонтандық мутациялар организмнің өзіндегі әлі толық анықталмаған себептерден (зат алмасу өнімдерінің, бос радикалдардың т.б. әсерлерінен) дамиды.

Бағытталған немесе **индукциялық мутация** көптеген сыртқы орта факторлары әсерлерінен дамиды. Бұл факторларды мутагендер дейді.

Мутагендер *физикалық, химиялық, биологиялық* болып ажыратылады.

Физикалық мутагендер: иондағыш сәулелердің барлық түрлері, ультракүлгін сәулелер, температура т.б. жатады.

Химиялық мутагендер:

- белок синтезін тежейтін цитостатиктер (меркаптопурин, теобромин т.б.)
- алкилдеуші қосындылар, яғни, ДНҚ молекуласына алкилді топтарды (метилді, этилді т.с.с.) тасуға қабілетті қосындылар. Оларды ДНҚ молекуласына әсер етуіне байланысты *радио миметиктер* деп атайды. Өйткені олардың әсер ету тетіктері радиациялық мутагенезге өте ұқсайды;
- асқын тотықтар;
- пуриндер мен пиримидиндер негіздерінің туындылары;
- сыртқы ортаның әртүрлі химиялық қосындыларымен ластануы бүгінгі күннің негізгі мәселелерінің бірі болып қаралады.

Биологиялық мутагендерге:

- вирустар(қызамықтың, шешектің, қызылшаның, паротиттің вирустары);
- биологиялық токсиндер;
- кейбір зат алмасу өнімдері: асқын тотықтар, бос радикалдар жатады. Соңғыларын аутомутагендер деп атайды.

Генетикалық жіктеу бойынша тұқым қуалайтын аурулар:

- моногендік;
- хромосомалық;
- мультифакторлық (полигендік) болып бөлінеді.

Моногенді аурулар генетикалық ақпарат жазылған құрылымдық гендердің мутацияға ұшырауынан туындайды. Бұл аурулардың ұрпақтарға берілуі Г.Мендельдің тұқым қуалау заңдылықтарына сәйкес жүретіндіктен мендельдік тұқым қуалайтын ауру деп аталады. Моногенді түрі аутосом.-доминантты, аутосом.-рецессивті және жыныстық Х- және У-хромосомалармен тіркескен (генге байланысты еркек ауырады, ал ауруды әйел адам тасымалдайды; гемофилия, т.б. дерттер) тұқым қуалайтын аурулар болып бөлінеді.

Мультифакторлық аурулар бірнеше геннің мутацияға ұшырауы мен өзара әрекеттесу нәтижесінде, ауруға бейімделуі артқан кезде және қоршаған орта факторларының әсеріне байланысты туындайды. Мұндай ауруларға: подагра; қант диабеті; гипертония; асқазан және ішектің ойық жарасы; атеросклероз; жүректің ишемия ауруы, т.б. жатады. Тұқым қуалайтын аурулардың бұл түрінің пайда болу себебі әлі толықтай анықталған жоқ.

Хромосомалық аурулар геномдық (хромосомалар санының өзгеруі) және хромосомалық (хромосомалар құрылысының өзгеруі) мутацияларға байланысты қалыптасады. Жиі кездесетін хромосома ауруларының қатарына трисомиялар жатады. Бұл кезде хромосома жұптарының бірінде қосымша 3-хросома пайда болады. Мысалы, Даун ауруында аутосом. 21-жұп бойынша трисомия, Патау синдромында 13-жұпта, Эдварс синдромында 18-жұбында болады. Гаметогенезде мейоздық бөлінудің бұзылуына байланысты әйелдерде жыныстық X – хромосомалардың біреуі болмаса, Шерешевский-Тернер синдромы, керісінше бір хромосом артық болса – трипл-X (ер адамдарда Клайнфельтер) синдромының қалыптасуына әкеледі. Жасы 35-тен асқан әйелдердің бала көтеруінде нәрестелердің хромосомалық аурумен туу қауіптілігі жоғары болады.

Рекомбинантты белоктарды қолдану

Ауру

- Қантты диабет
- Гипофизарлы ергежейлілік
- Гемофилия А
- Гемофилия В
- Тұқымқуалаушылық эмфизема
- (нарушение функции легких)
- Аденозиндезамин дефициті SCID

Рекомбинантты белок

- Инсулин
- Адам өсу гормоны
- Қан ұю факторы VIII
- Қан ұю факторы IX
- 1-антитрипсин
- Аденозиндезаминаза

Физиологиялық және биохимиялық процесстердің коррекциясы

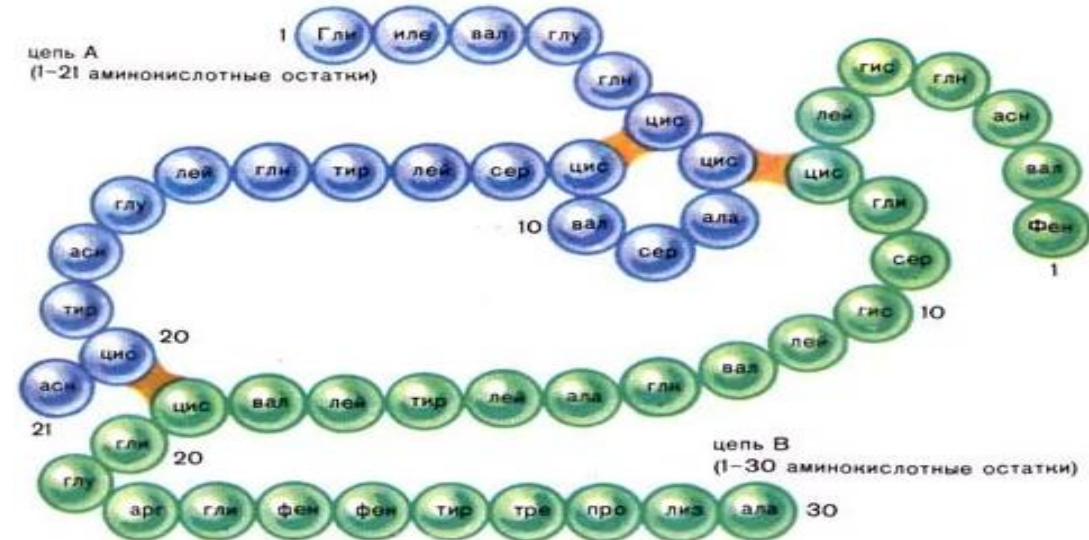
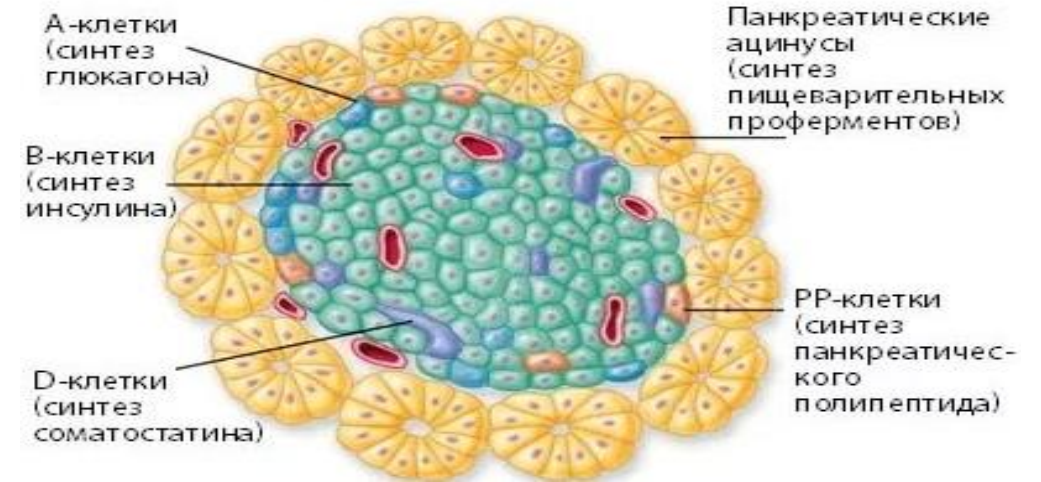
- Ферменттің немесе гормонның дефицитін қалпына келтіру
- Жиналатын метаболитті алып тастау (Вильсона-Коновалова ауруы)
- Зақымдалған ұлпаның орнын толтыру

Тұқымқуалайтын ауруларда рекомбинантты белоктарды енгізу тек симптомдарды жоюға ғана әсер етеді. Ген дефекті сақталады.

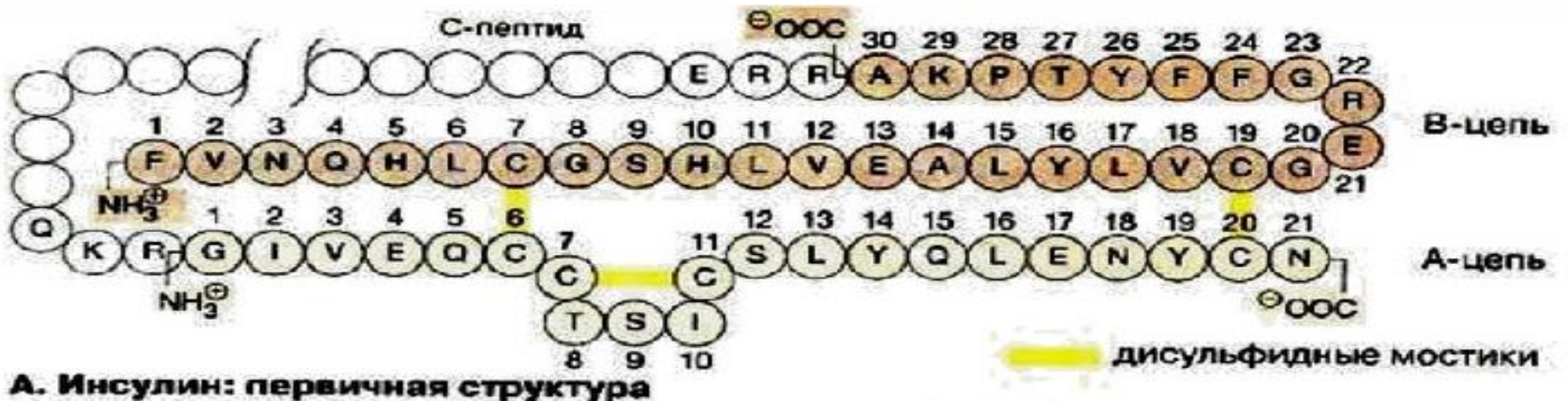
Инсулин - бұл Лангерганс аралының β -жасушалары бөлетін пептидтік гормон.

Екі пептидтік тізбектен тұрады: А-тізбегі - 21 аминқышқылының қалдықтарынан. В тізбегінде 30 аминқышқылының қалдықтары бар. Екі тізбек инсулин ақуызының кеңістіктік құрылымын қамтамасыз ететін дисульфид –S-S байланыстарымен байланысқан.

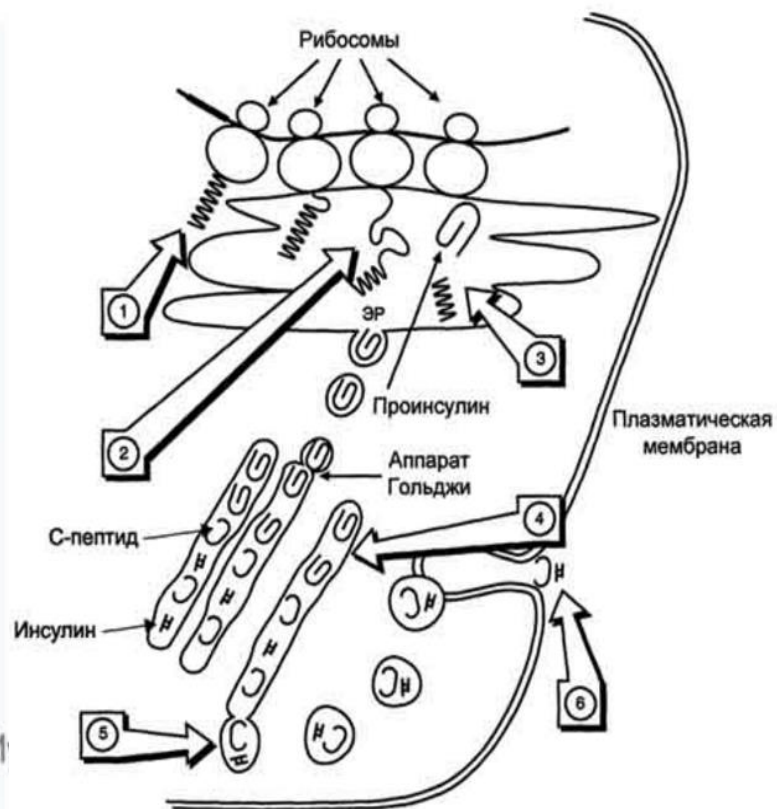
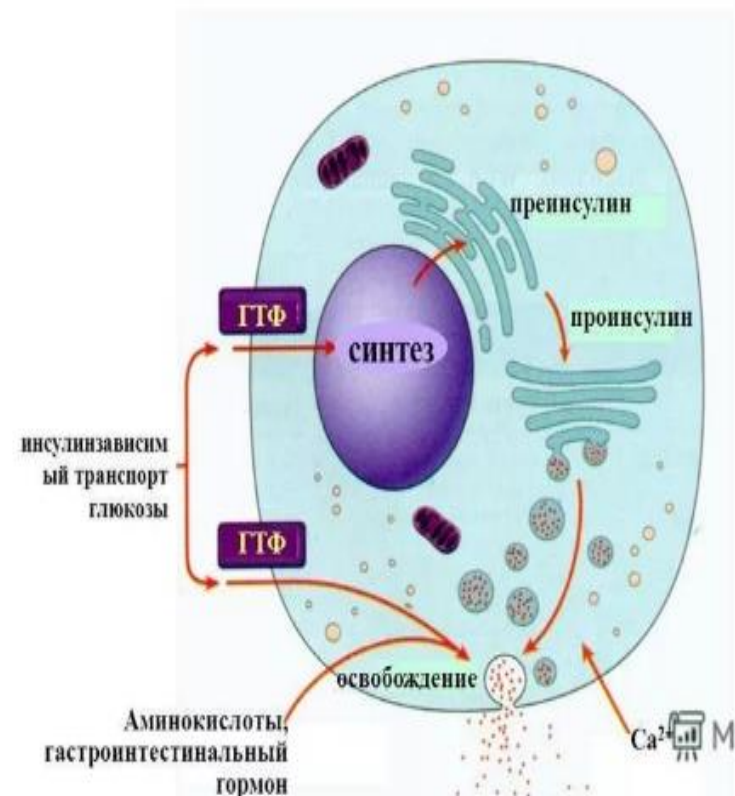
Островки Лангерганса поджелудочной железы



Ұйқы безінде инсулин синтезделгенде алдымен инсулиннің ізашары - проинсулин пайда болады. Ол А-тізбектен, В-тізбектен және 35 амин қышқылының қалдықтарынан тұратын С-пептидтен тұрады. С-пептид карбоксипептидаза және трипсин арқылы бөлінеді, ал проинсулин белсенді инсулинге айналады.



СИНТЕЗ И СЕКРЕЦИЯ ИНСУЛИНА



ER - эндоплазмалық тор.
1 - сигнал пептидінің түзілуі;
2 - препроинсулин синтезі;
3 - сигнал пептидінің бөлінуі;
4 - проинсулинді Гольджи аппаратына тасымалдау;
5 - проинсулинді инсулинге және С-пептидке айналдыру және инсулин мен С-пептидті секреторлы түйіршіктерге қосу;
6 - инсулин мен С-пептидтің бөлінуі.



Рекомбинантты инсулин алғанға дейін дәрі шошқа мен сиырдың ұйқы безінен алынған. Алайда инсулин өндірісінің бұл әдісі бірқатар кемшіліктерге ие болды:

Мал басының жетіспеушілігі;

шикізатты сақтау мен тасымалдаудың күрделілігі;

гормонды оқшаулау және тазарту қиындықтары;

аллергиялық реакциялардың даму мүмкіндігі.



Таблица 1. Различия аминокислотных последовательностей у некоторых млекопитающих

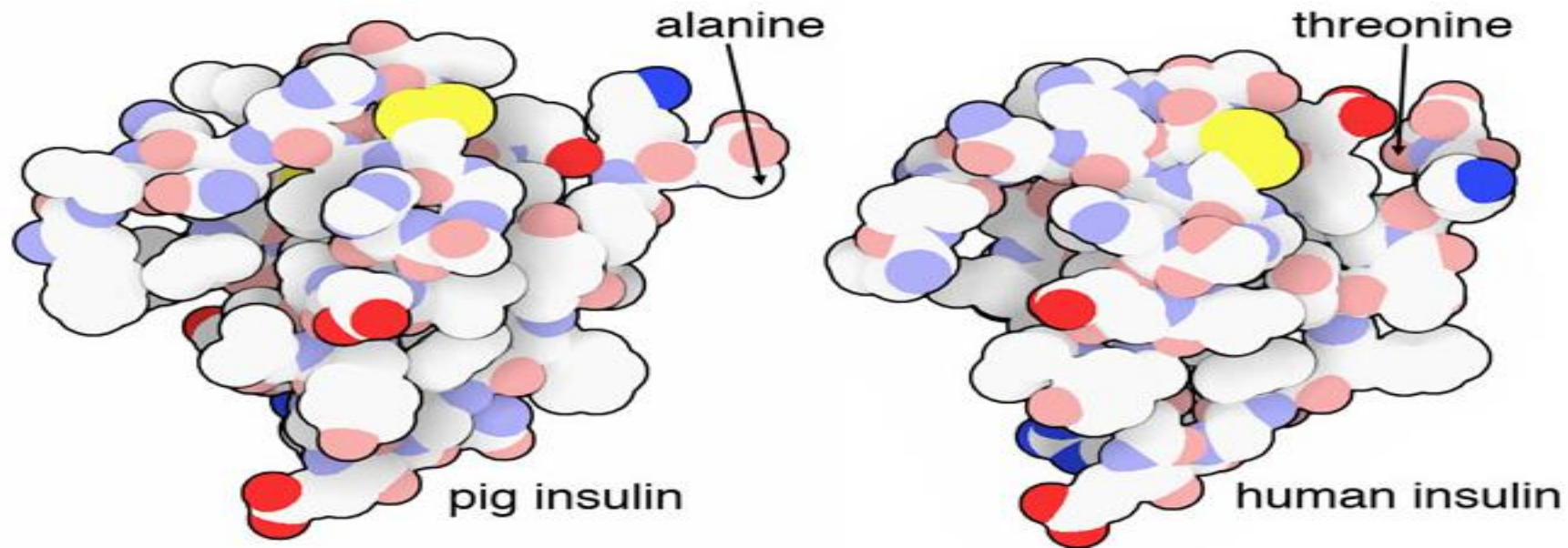
Положение аминокислот				
Инсулин	А-цепь			В-цепь
	8	9	10	30
Человек	треонин	серин	изолейцин	треонин
Свинья	треонин	серин	изолейцин	аланин
Кролик	треонин	серин	изолейцин	серин
Крупный рогатый скот	аланин	серин	валин	аланин
Овца	аланин	глицин	валин	аланин
Собака	треонин	серин	изолейцин	аланин
Кит	аланин	серин	треонин	аланин

Этапы разви

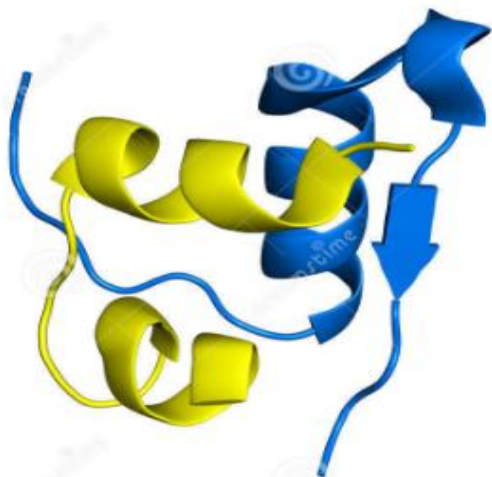
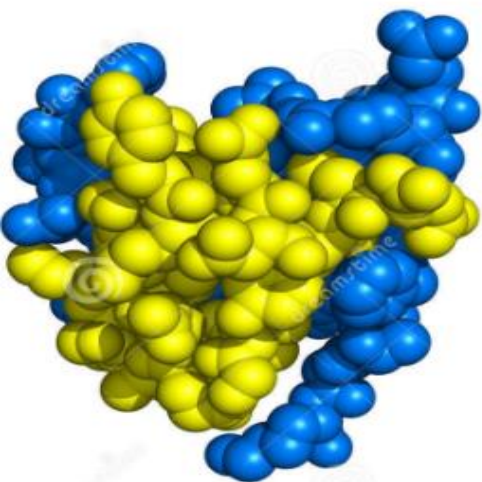


Синтетикалық-ферментативті әдіспен шошқа инсулинін модификациялау

Әдіс шошқа инсулинінің адам инсулинінен В тізбегінің С-терминалындағы Ala30Thr бір алмастырумен ерекшеленетіндігіне негізделген. Аланинді треонинмен алмастыру аланиннің ферменттік-катализденген бөлінуі және оның орнына реакция қоспасында көп болатын карбоксилден қорғалған треонин қалдықтарын қосу арқылы жүзеге асырылады. Қорғаныс О-терт-бутил тобы бөлінгеннен кейін адам инсулині алынады.



Гендік – инженериялық әдіс



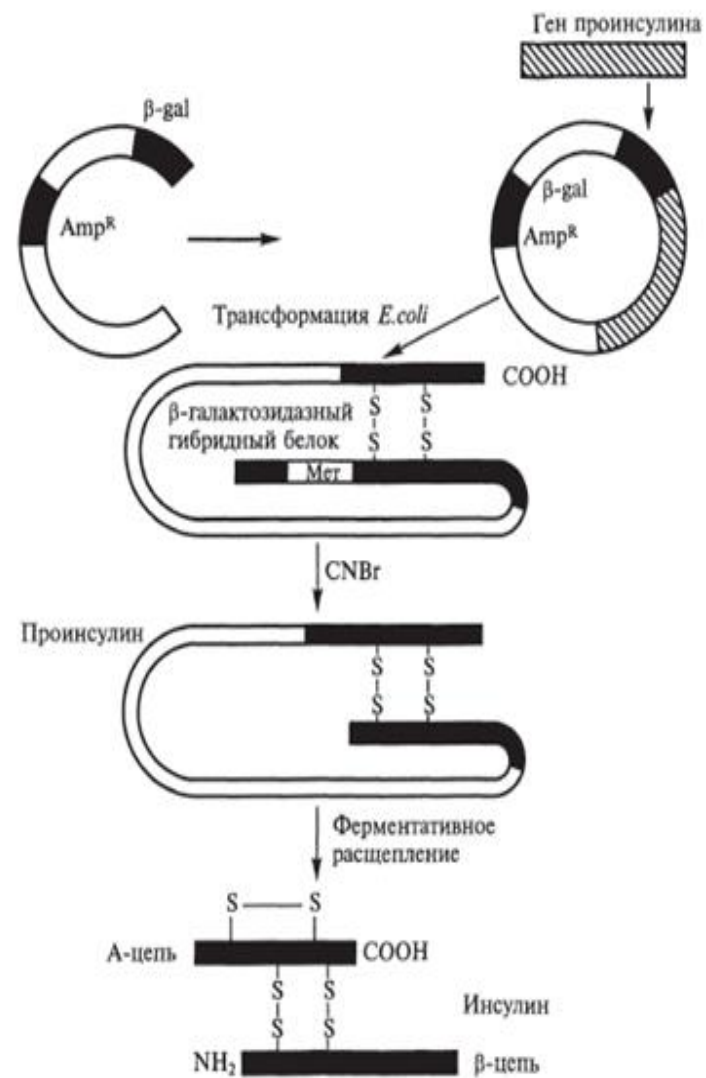
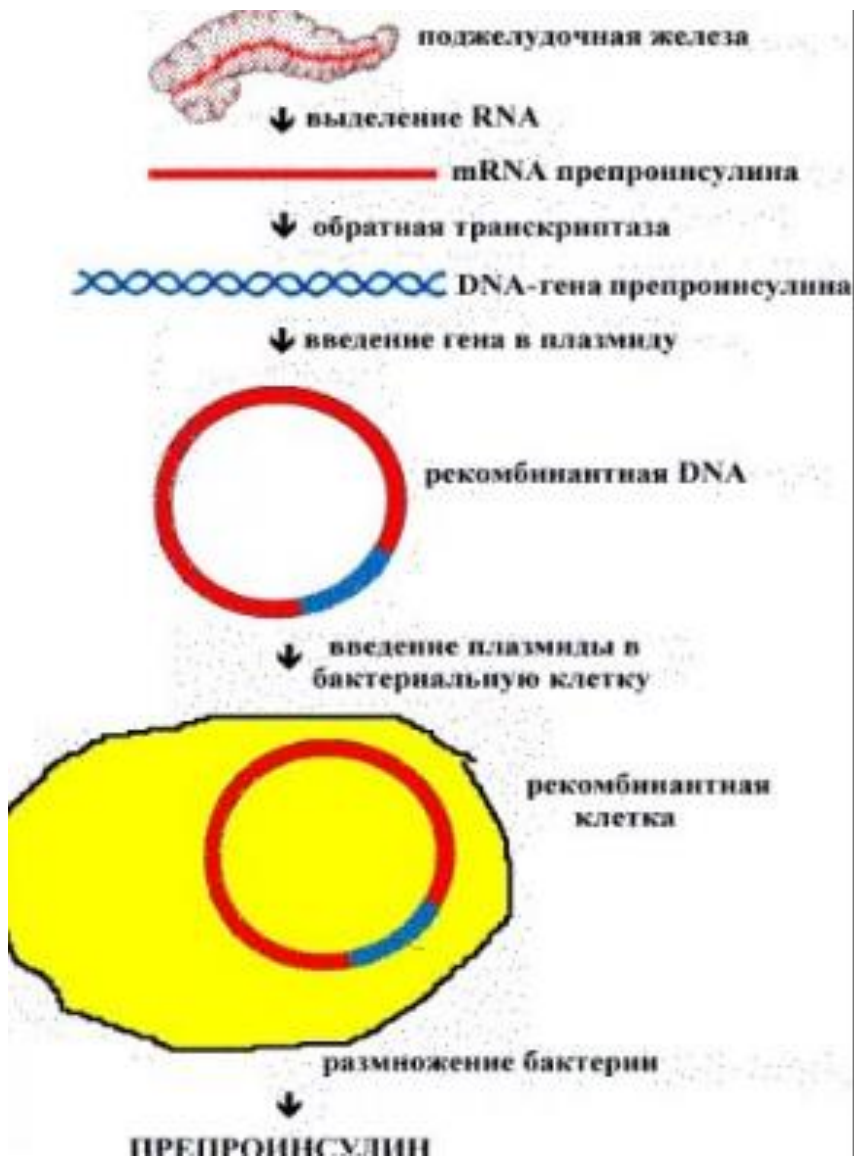
2 жолы:

Екі тізбектің бөлек өндірісі (әртүрлі штамдар - өндірушілер) кейіннен бүктеліп (дисульфидті көпірлер түзілуі), изоформалардың бөлінуі



Проинсулин түрінде алу, содан кейін трипсинмен және карбоксипептидазамен гормонның белсенді түріне дейін ферментативті бөліну

Инсулинді гендік инженерия арқылы алу схемасы



Способ синтеза инсулина человеческого с помощью *E. coli* позволяет получить инсулин более высокого качества и степени очистки с чистотой не ниже 96% и активностью не ниже 26 Е/мг.



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-инфилттрлеуші 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.

Нысанды клетка типі бойынша



Жыныс клеткаларындағы гендік терапия

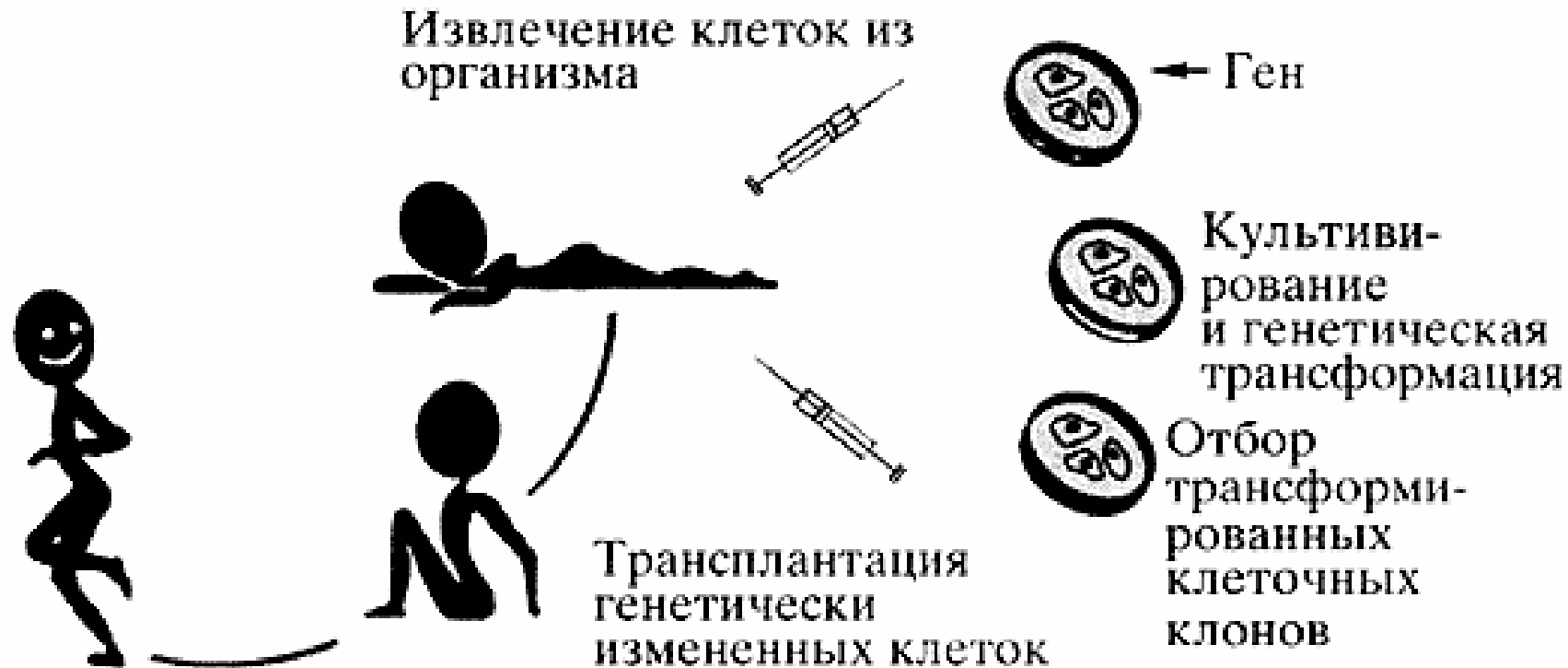
Терапияның бұл түрінде генетикалық құрылымды зиготаға немесе эмбрионға дамудың ерте сатысында енгізеді (in utero жағдайында гендерді енгізу). Енгізілген материал реципиенттің барлық жасушасына түседі деп күтіледі (келесі ұрпаққа тасымалдай отырып, тіпті жыныс жасушаларына да түседі).

Адамға әсері:

- Эмбриондарды «жақсарту» – түрлі ауруға қарсы тұру қабілетін жақсартады
- тапсырыс берушінің қалауынша баланы әдемі және мықты етіп жасайды
- Баланың жынысын анықтауға болады

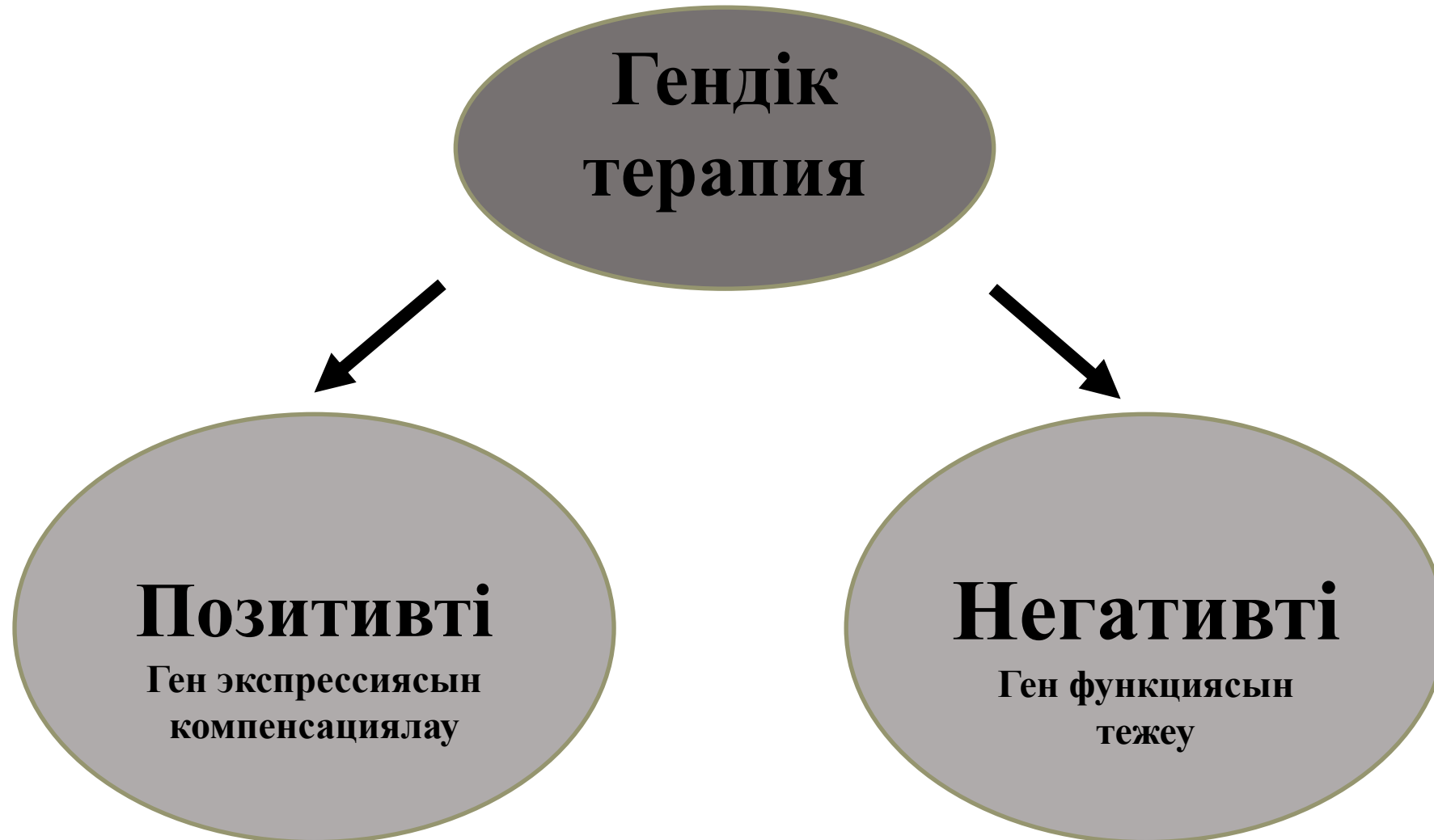


Соматикалық клеткадағы гендік терапия



Бұл әдісте генетикалық материалды тек соматикалық жасушаға енгізеді және ол жыныс жасушаларына берілмейді. Соматикалық гендік терапияда генетикалық конструкция жүйелі түрде – (вена ішілік, бұлшықет ішілік) және локальды – (тамырлар, мүшелер, ісіктер) енгізіледі және терапевтік протокол негізінде жасалады.

Әсер ету типі бойынша



Позитивті гендік терапия



Позитивті гендік терапия экспрессиясы жеткіліксіз немесе толықтай жойылған генді немесе оның «бүлінген» бөлігін қалыпты, өз қызметін толық атқаратын генге ауыстыру арқылы геннің функциясын қалпына келтіруге бағытталған.

Мысалы, таргетинг немесе гендік коррекция арқылы. Бұл әдістің, ұқыпты орындалғанына қарамастан, нақтылығы жеткіліксіз. Ауру ген өз қызметін жалғастыра берсе де, бұл геннің ақуыз өнімі төмен болса, қосымша сау ген енгізіледі. Сол себептен жетіспеген өнімнің мөлшері көтеріледі. Бұл тәсіл **қосымша ГТ** деп аталады. Осындай кездейсоқ енгізуі трансгеноздың әсерімен ұқсас. Инсерциялық (енгізілетін) мутагенездің араласуымен орындалатын трансгендік экспрессиясы дұрыс реттелмеуі де мүмкін. Рецессивті ауруларды алынған эктопикалық трансген атты трансгендік организмнің көмегімен емдеуге болады. Керісінше, доминантты аурулар, қалыпты, қызметі сақталған геннің енгізілгеніне қарамастан өз әсерін тигізеді. Осындай қиын жағдайда қалыпты генді орнатпай, ауру генді әлсіздендіруге немесе белсенділігінен толығымен айыруға болады.

Негативті гендік терапия



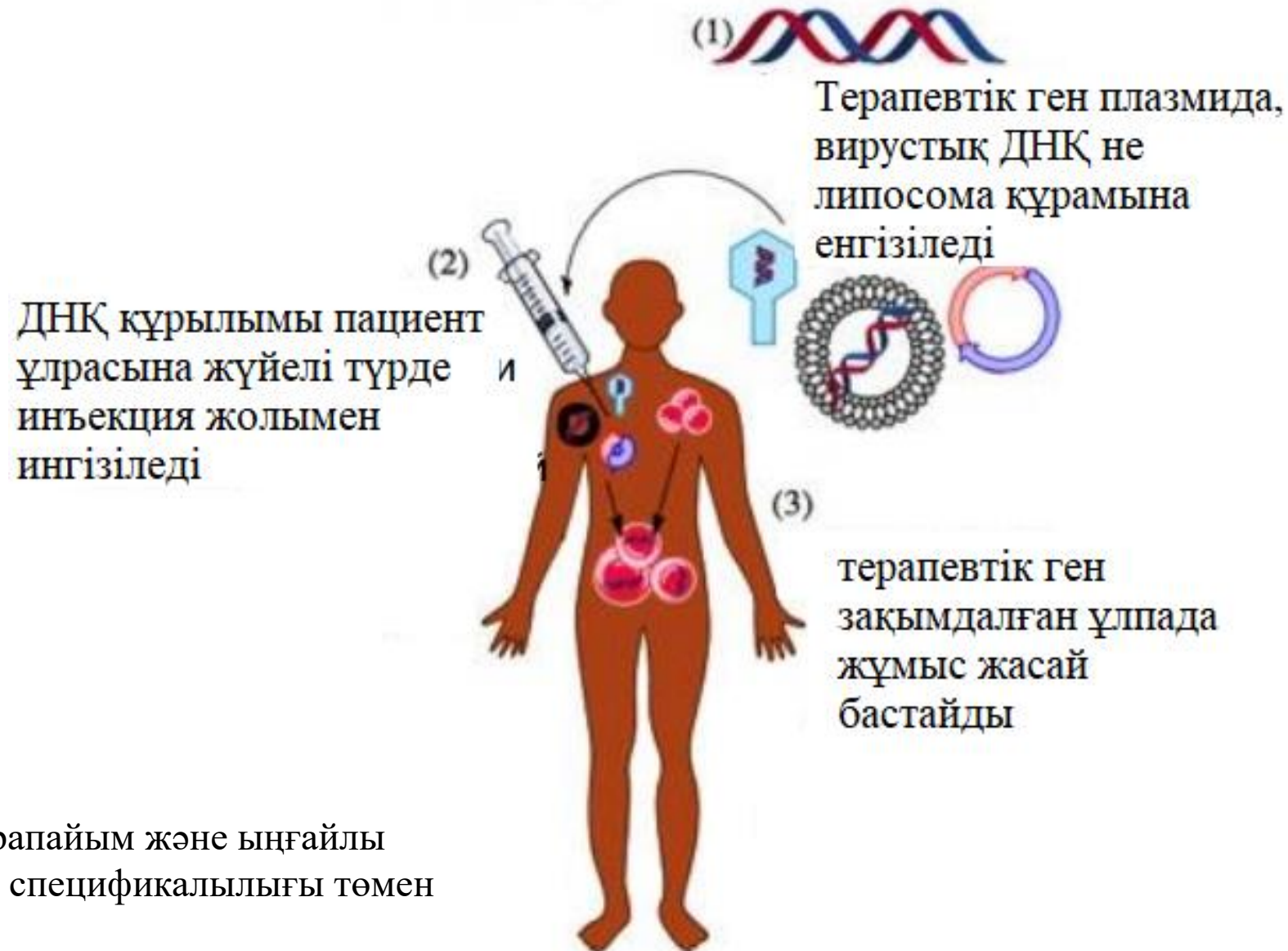
Инфекция немесе ісіктік трансформация кезінде көбіне қалыпты жасушаға тән емес геннің артық қызметінің нәтижесінде ауру туындайды. Бұндай жағдайда гендік терапия жоғары активті генді басуға немесе ауру геннің қызметін генетикалық құрылымды жасушаға енгізу арқылы басып тастауға бағытталған.

Тиімсіз гендердің немесе қауіпті гендердің экспрессиясын тежеу үшін жасушаға қосымша гендік құрылымдар енгізіледі. Бұл гендік құрылымдар экспрессияланған кезде ұнамсыз геннің өнімдерімен әрекеттесетін туындыларды беріп, ұнамсыз гендік өнімінің зиянды әсері жойылады. Мысалы, жасуша құрамындағы қажетсіз ақуызға қарсы антиденелерді реттейтін гендерін енгізуге болады (Richardson e.a., 1995). Синтезделген антиденелер бұл жағдайда ұнамсыз ақуызбен байланысып, бұл ақуызды залалсыздандырады. Бұл үдерісті басқаша жасушаішілік иммунизация деп атайды. Жеке ақуыз деңгейінде нормадан ауытқыған геннің залалды әсері жойылады. Жасуша ішілік антиденелер интраденелер деп аталады

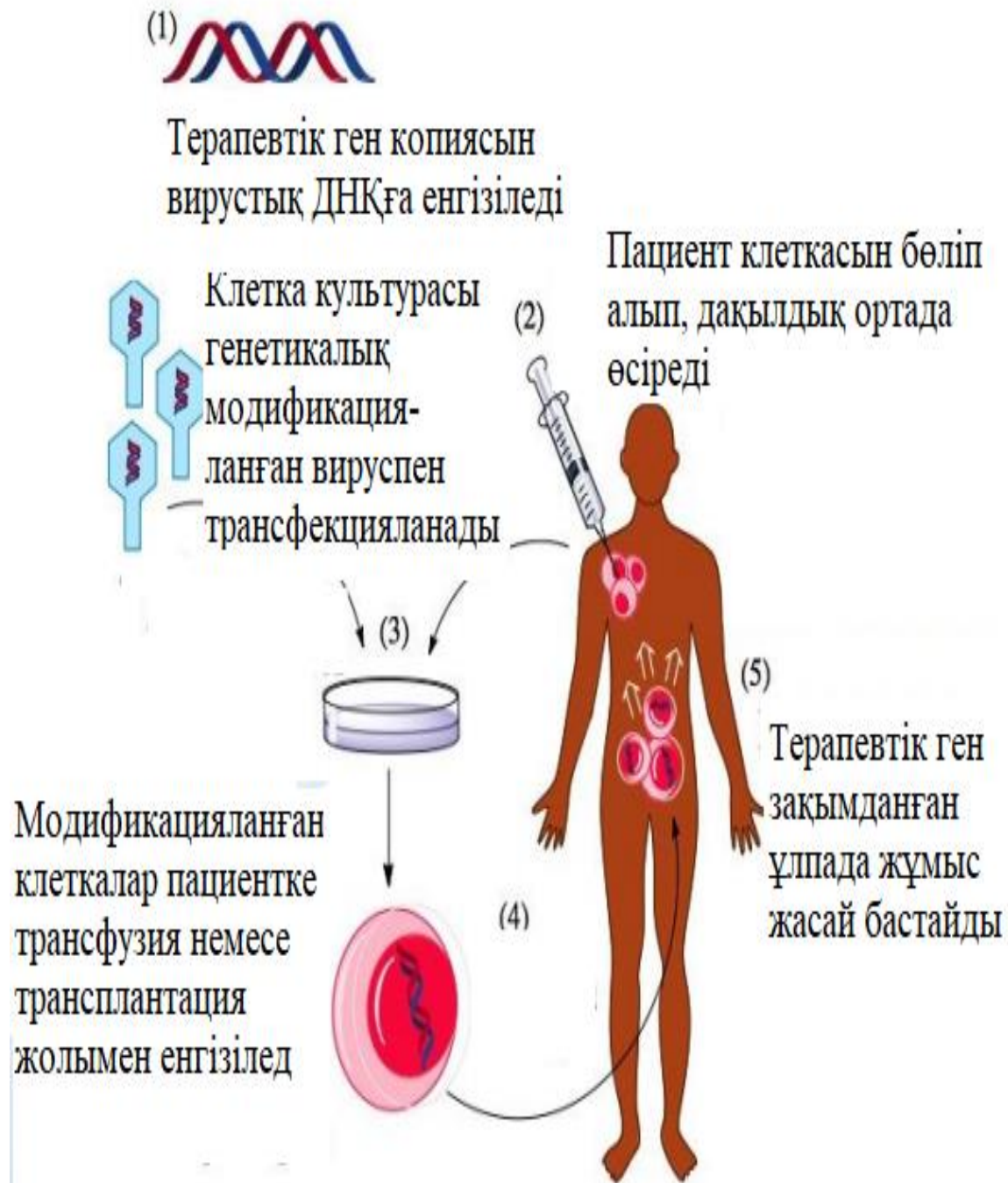
Ген терапиясының түрлері

- Қазіргі уақытта вектордың зақымдалған клеткаларға жеткізілуі арқылы ерекшеленетін ген терапиясының үш негізгі түрі бар.
- **Генді терапия ex vivo.** Зақымдалған клеткалар пациенттің денесінен бөлініп, вектормен инкубацияланады, одан кейін генетикалық модификацияланған клеткалар сұрыпталып ағзаға қайта енгізіледі.
- **Генді терапия in situ (локальді).** Бұл жағдайда терапевтік ген тікелей тамырлар, мүшелер, ісік клеткаларына енгізіледі.
- **Генді терапия in vivo (жүйелі)** – терапевтік ген вена ішілік, бұлшықет ішілік енгізіледі. Осы уақытқа дейін бұл әдіс практикада қолданылмады, бірақ әдіс қарапайым және ыңғайлы, сондықтан ол ең перспективалы болып саналады.
- **Генді терапия in utero** – терапевтік ген зиготаға немесе эмбрионға дамудың ерте сатысында енгізеді

ГТ in vivo қалыпты ген тікелей адамның ұлпасына
(арнайы ұлпа жасушаларына) енгізіледі.



әдіс қарапайым және ыңғайлы
Алайда спецификалылығы төмен



ГТ ex vivo (ағзадан тыс) бұл жағдайда геннің қалыпты көшірмесі науқастан бөлініп алынған сомалық жасушаға енгізіледі. Түзетілген жасушалар өсіріліп, науқасқа трансфузия немесе трансплантация жолымен енгізіледі. Науқастың өзінің жасушасы алынғандықтан иммундық жүйе бұндай жасушаларды бөлмей, ыдыратпай қабылдайды. Жасушаға енгізілген қалыпты ген жетіспеген өнімді (ақуыз, фермент) синтездейді. Бұл әдіс бойынша жеке жасушаның орнына, ұзақ мерзім тіршілік ететін жасушалар жиынтығы нысана ретінде пайдаланылады. Мысалы, бағаналы жасушалар, фибробласттар.

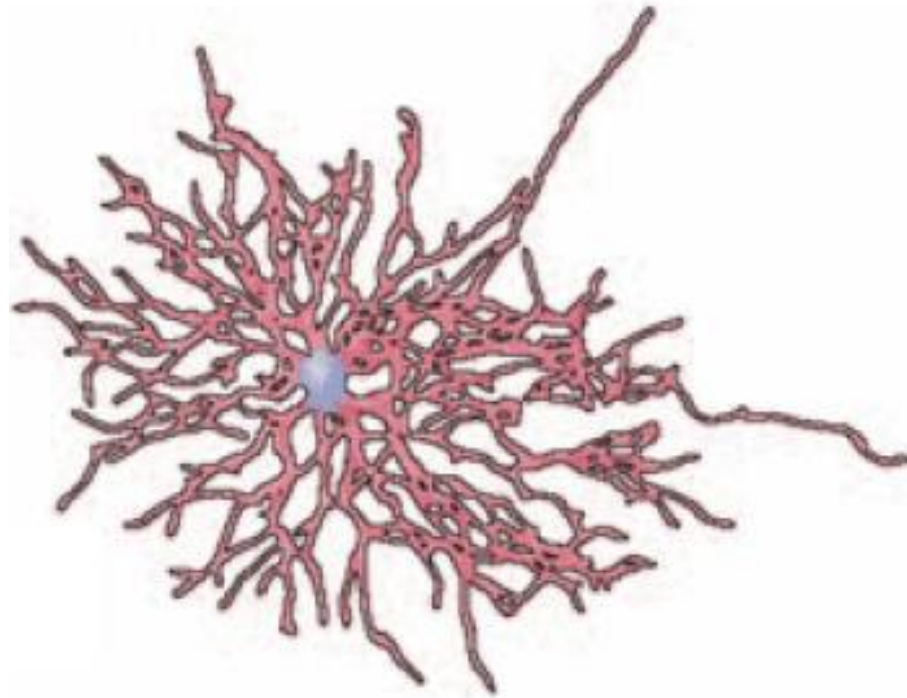
Ex vivo гендік терапияның баламалы әдісі мембранаға қоршалған **аутологиялық емес** жасушалардың генетикалық инженерияланған модификациясын қолданады, бұл қажетсіз реакцияның дамуына жол бермейді және жасанды мембрана «терапевтік» ген өнімін шығаруға кедергі келтірмейді.

Ex vivo гендік терапия терапевтік ақуыз өндіретін генетикалық түрлендірілген жасушаларды трансплантациялауға негізделген.

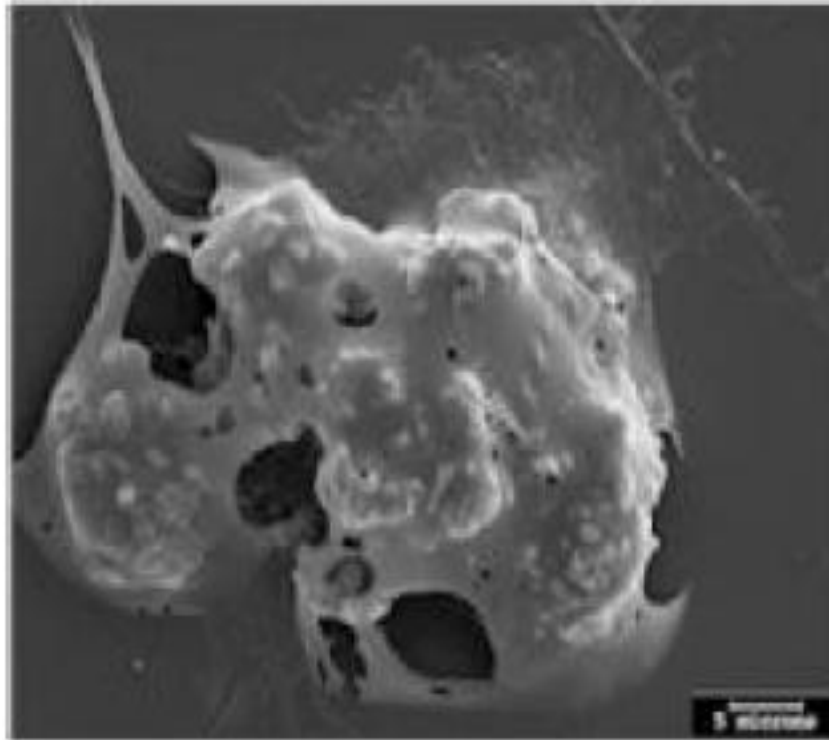
Пациенттің өз жеке жасушаларын қолдану олардың қабылданбауына жол бермейді, бірақ ex vivo гендік терапия шеңберін шектейді. Мысалы, мақсатты тіндегі жасушалардың саны оларды экстракциялау және өсіру үшін жеткіліксіз болуы мүмкін, кейбір соматикалық жасушалар ДНҚ-ны тиімсіз сіңіреді, ал клондалған геннің экспрессиясы кейде уақытша болады. Сондықтан қазіргі кезде **аутологиялық емес** (ксеногендік, аллогендік) жасушаларды ***иммундық жауаптан қорғайтын және «терапевтік» ақуыздың бөлінуіне мүмкіндік беретін*** жүйелер жасалуда.

Аутологиялық емес ex vivo гендік терапия қоректік ортада жақсы өсетін тіндерге тән жасушаларды оқшаулауды қамтиды (мысалы, фибробласттар немесе кератиноциттер, мидың астроциттері, гепатоциттер немесе миобласттар) және олардың «терапевтік» генін қолданумен генетикалық модификациясы . Рекомбинантты жасушалар ***жасанды жартылай өткізгіш полимерлі мембранамен қоршалған***, ол арқылы рекомбинантты белок бөлініп, қоректік заттар жасушаларға енеді. ***Мембрана иммуногенді емес және имплантацияланған жасушаларда пациенттің сенсублизациясы мен қабылдамауын тудырмайды.***

Инкапсуляциялық материал ретінде әр түрлі полимерлер қолданылады: альгинат - поли-L-лизин - альгинат, полиэтерсульфон, поли (акрилонитрил-ко-винилхлорид). Клиникаға дейінгі модель жануарларға жүргізілген in vitro сынақтар инкапсуляцияланған рекомбинант жасушалар көбеюі және ұзақ уақыт бойы көп мөлшерде рекомбинантты белок түзуі мүмкін екенін көрсетті .



- *ex vivo* жағдайында стратегия жүзеге асу үшін генетикалық ақпаратты тасымалдау құралы ретінде аутогендік біріншілік жасушалар (бластоциттер) қолданылуы мүмкін. Бірінші тәжірибе біріншілік астроциттермен жүргізілді, олар ересек донордан алынып, трансфецирленген және содан кейін орталық жүйке жүйесінің ұлпасына орналастырылған, ол жерде бұл жасушалар енгізілген геннің ұзақ экспрессиясын бір қалыпты ұстап тұрған.
- **Астроцит** ([лат.](#) *astrocytus*; [грек.](#) *astron* — «жұлдыз»; и *kýtos* — «жасуша») — эктодермадан дамитын, пішіні жұлдыз тәрізді нейроглиялыды клетка.



- 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 бағаналы жасушаларының негізгі ерекшелігіне жатады. Яғни енгізілген генетикалық құрылымның ұзақ мерзімді экспрессиясын ұстап тұру және бағаналы жасушаларының ұзақ тіршілік етуін көрсетеді.

- ретровирустар
- аденовирустар
- аденоассоцияланған вирустар
- Жел шешегі вирусы
- лентивирустар

Вирустық

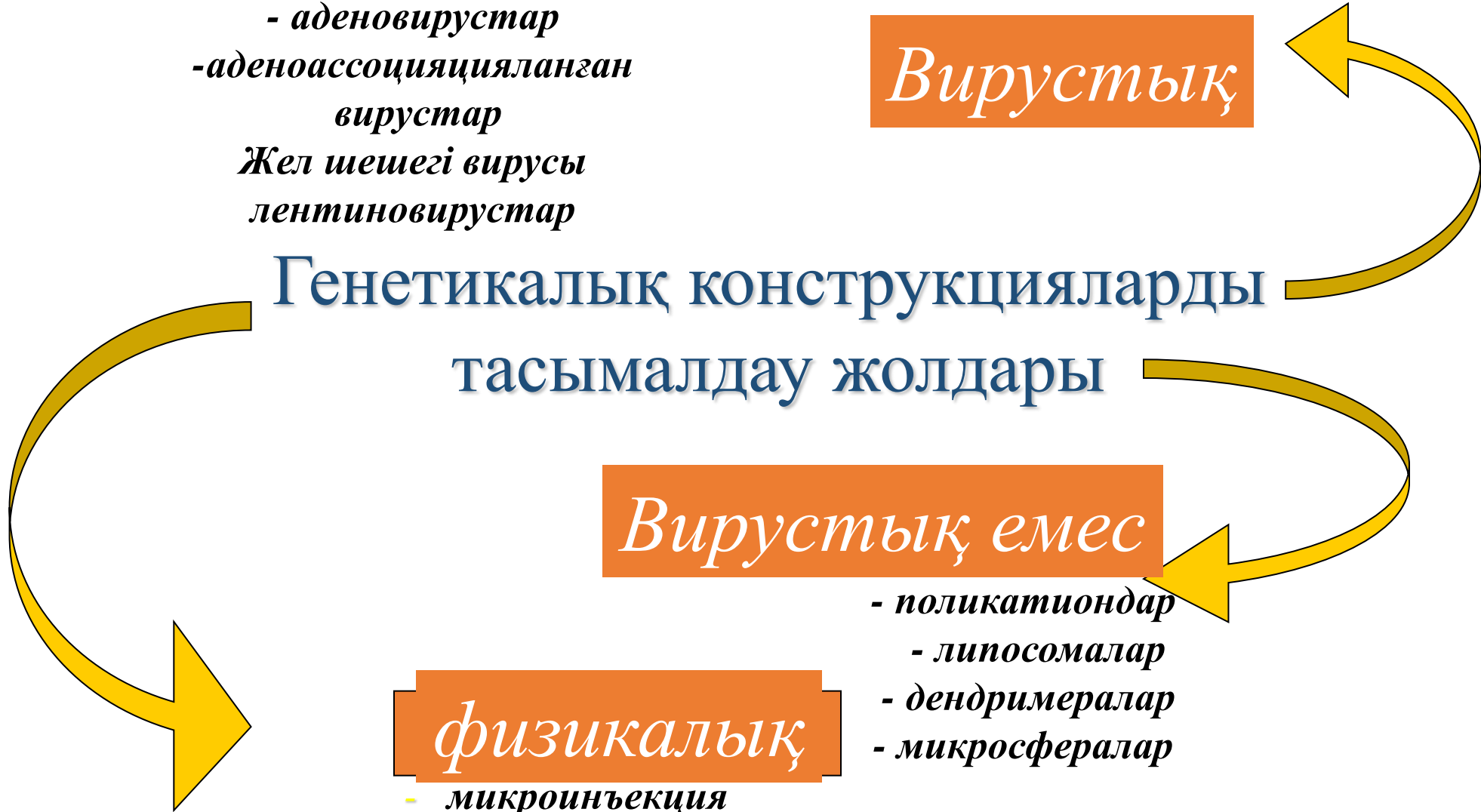
Генетикалық конструкцияларды тасымалдау жолдары

Вирустық емес

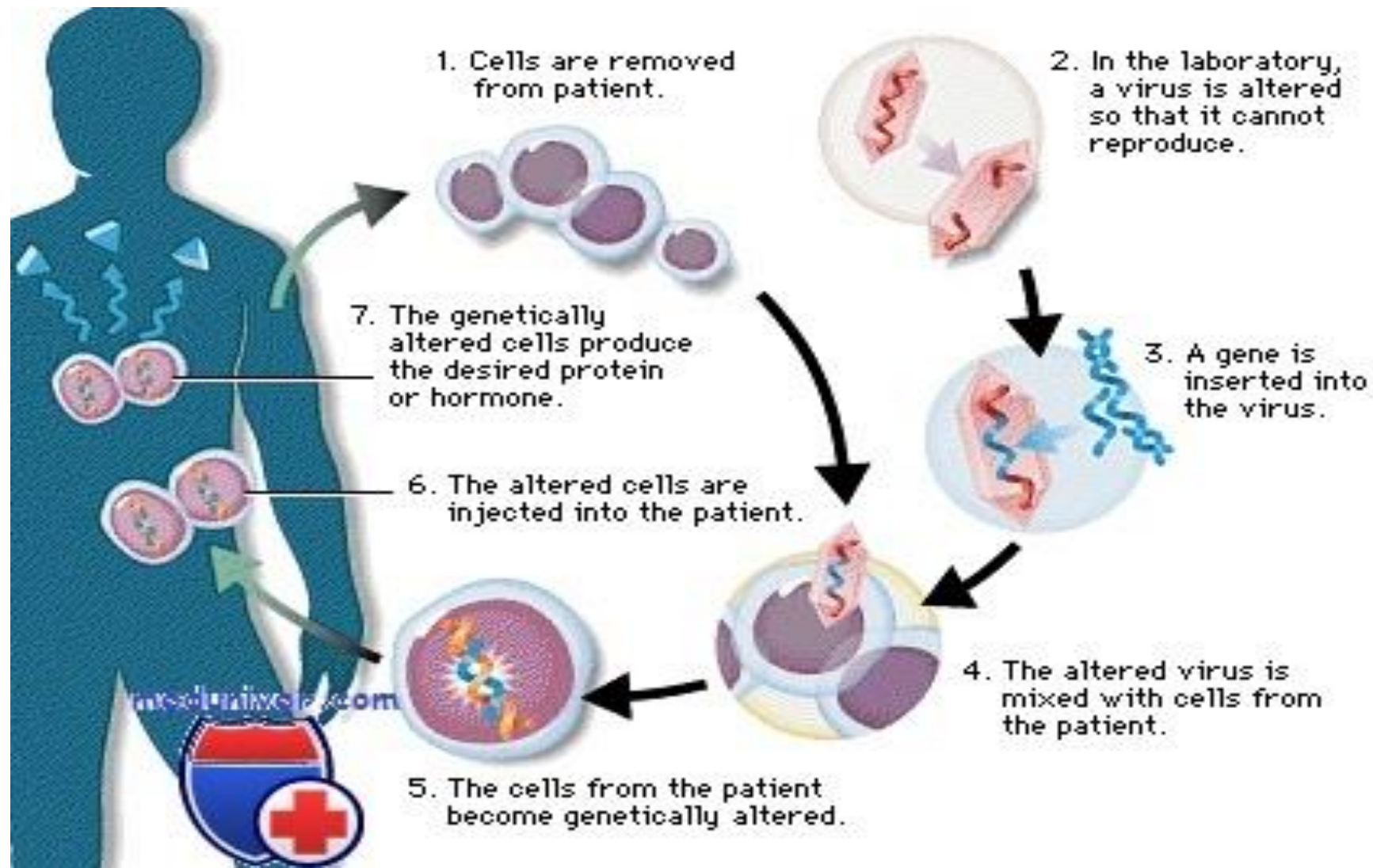
- поликатиондар
- липосомалар
- дендримералар
- микросфералар

физикалық

- микроинъекция
- электропорация
- гендік пушка
- ультразвук



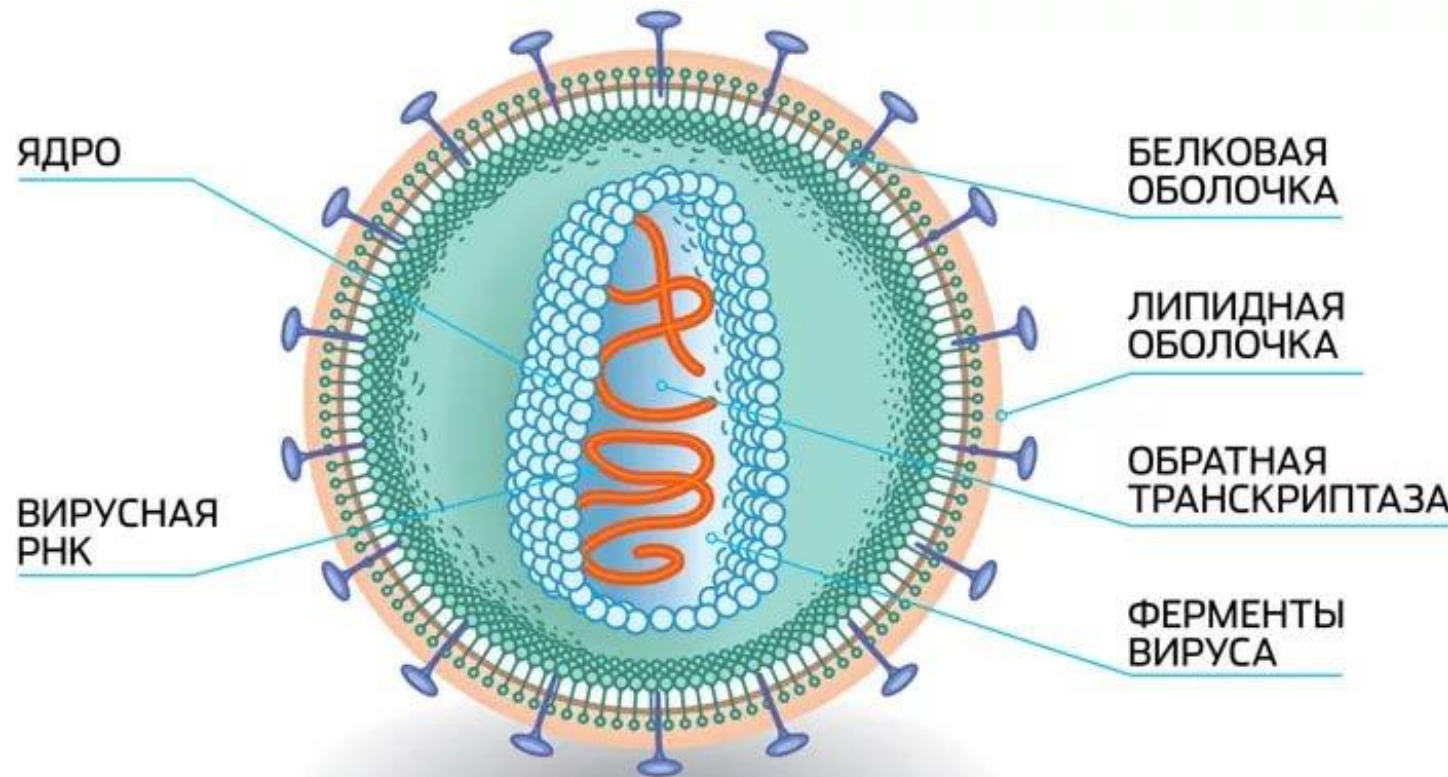
Вирустық векторлар көмегімен гендік терапия принципі

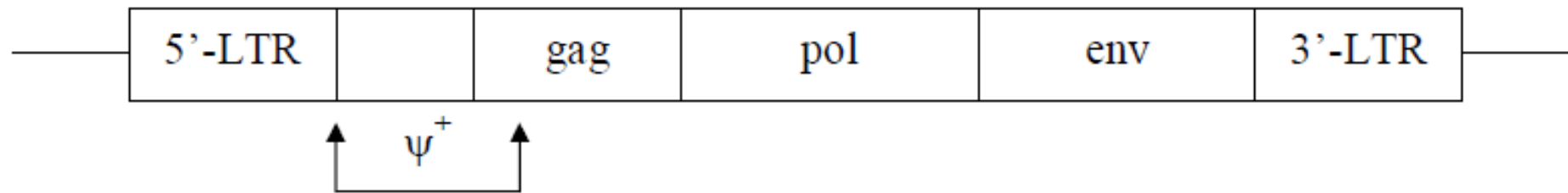


Ретровирустар- Retroviridae тұқымдастығына кіретін 150-дей түрлерді қамтитын, ісік туғызатын вирустар.

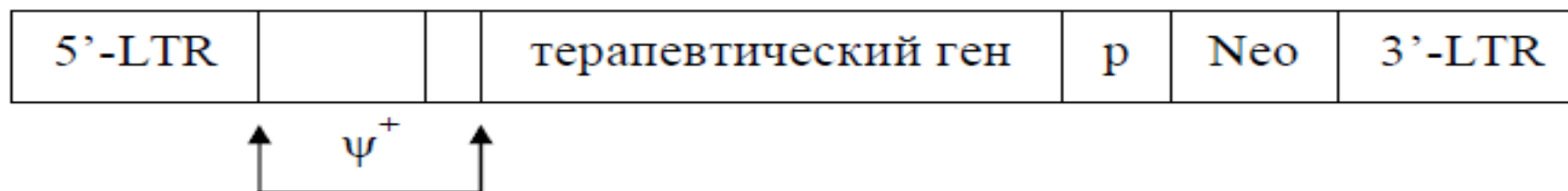
Түрі-диаметрі 100-140 нм сфера тәрізді, Липопротеид қабықпен қапталған. Сыртқы қабаты-2 гликопротеидтен (Gp 120, Gp 41) қалыптасады – иммунды клеткаларын тіркелу әрекетін атқарады. Ішкі қабаты-белок р.17-ден құрылған –клетка орталығын тығыз қоршайды.

Геномы (+) РНҚ- ның екі жіпшесінен тұрады, құрамында 7900-9800 нуклеотидтік қосақтар және вирустық үш фермент (кері транскриптаза, протеаза және интеграз) бар. Вирус геномы негізгі 3 құрылымдық геномдерден (*gag*, *pol*, *env*), 7 реттегіш және функционалдық гендерден (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *vpx*) тұрады.



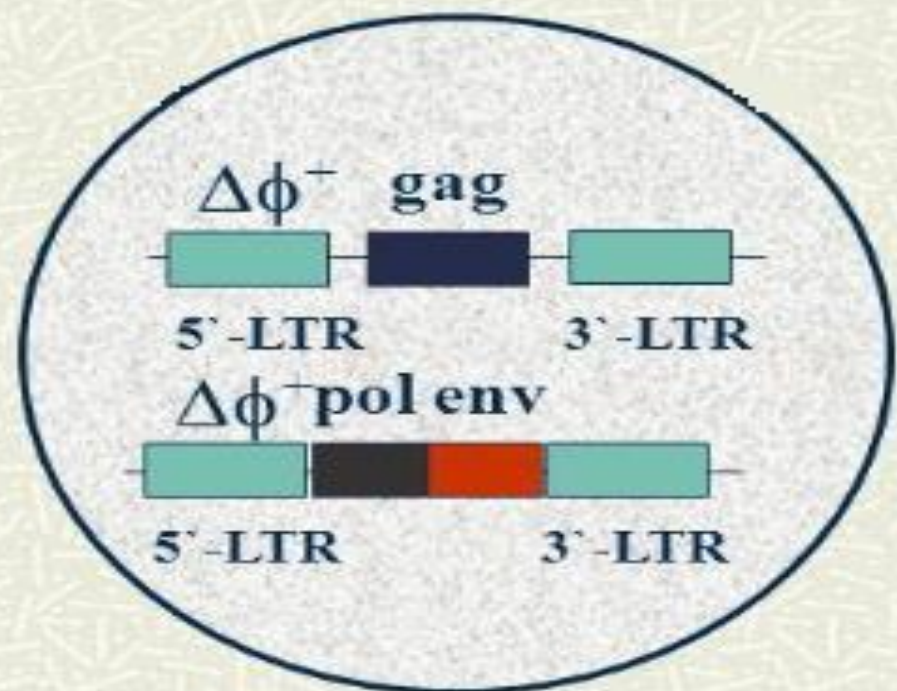


- Ретровирус провирусының геномының құрылымдық ұйымдасуы
- 5'-LTR – транскрипцияның реттеуші сигналын алып жүретін ұзын соңғы қайталау;
- 3'-LTR – полиаденилдеуді алып жүретін тізбек;
- ψ^+ - вирустық РНҚ-ны қаптау үшін қажетті ψ^+ тізбегі;
- gag – ішкі капсидтің құрылымдық белогын кодтаушы белок;
-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



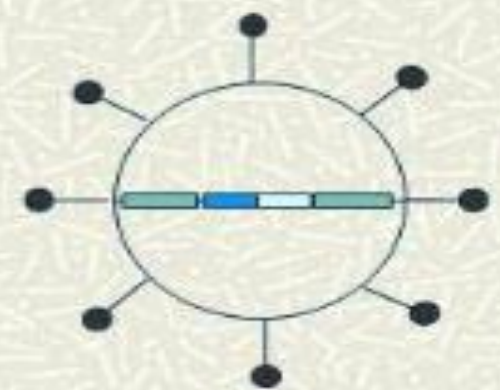
- Вектор құрастыруға арналған ДНҚ ретровирусының модификациясы
- ψ^+ - қаптаушы сигнал;
- Neo - селективті маркер;
- P –Neo транскрипциясына арналған вирустық промотор

Ретровирусные векторы

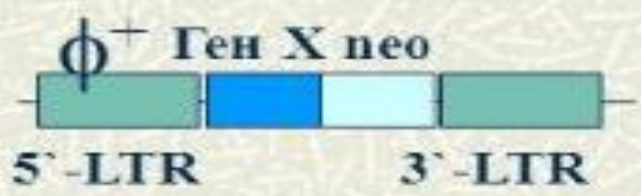


Пакующая клеточная линия

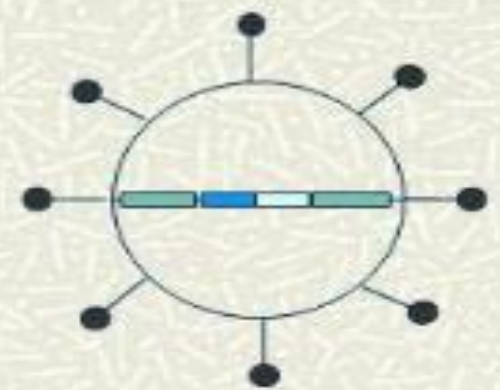
Трансфекция
продуцирующей
линии клеток

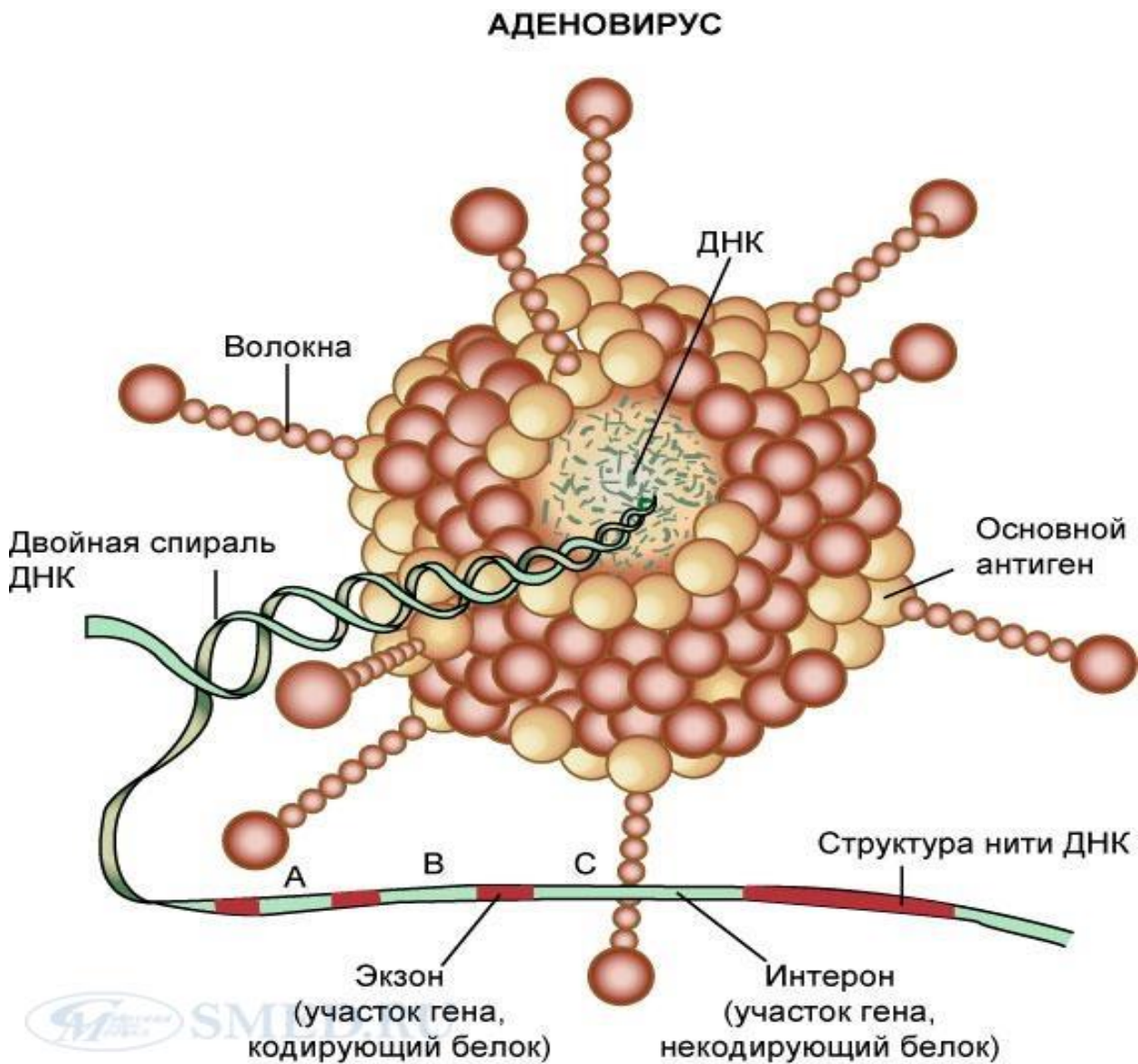


Упакованная РНК



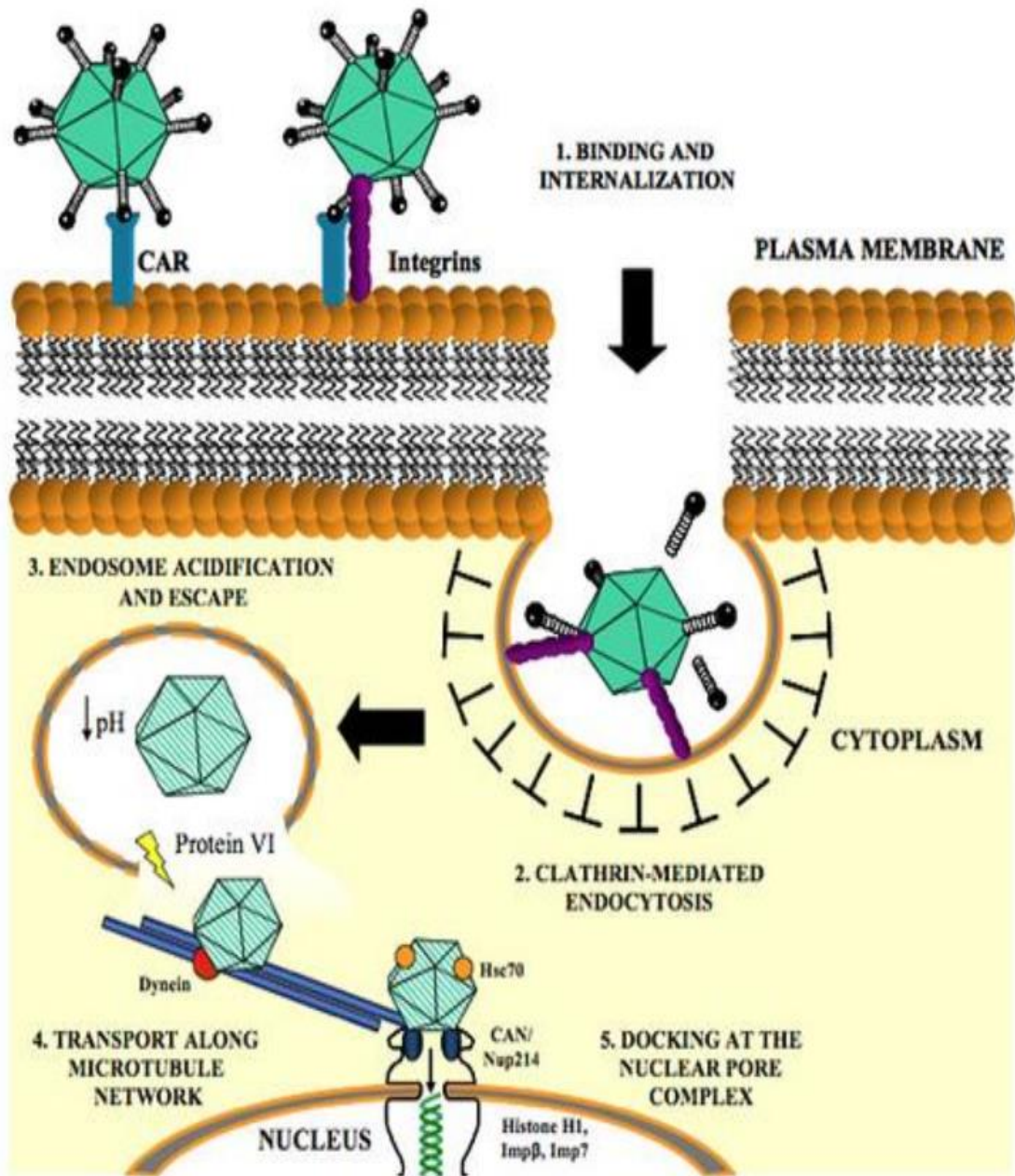
Плазмидный вектор с пакующим сигналом





- Геномы ДНК болып келетін вирус, Бірінші рет 1953 жылы аденойд ұлпасынан бөлініп алынған
- Шамамен 100 жуық серотиптері анықталған, оның 47-і адамды инфекциялайды
- Капсид гексон жіне пентон белоктарынан тұрады. Пентондардан белокты өсінділер шығады, оларды фибрилдер деп атайды.
- ДНК-сы қостізбекті сызықты, ұзындығы 36 м.ж.н.. ДНК –ның 5' – сондарына молекулалық массасы 56 kDa терминалды белоктар байланысқан. ITR вирустың ДНК репликациясына қажет праймер ролін атқарады.

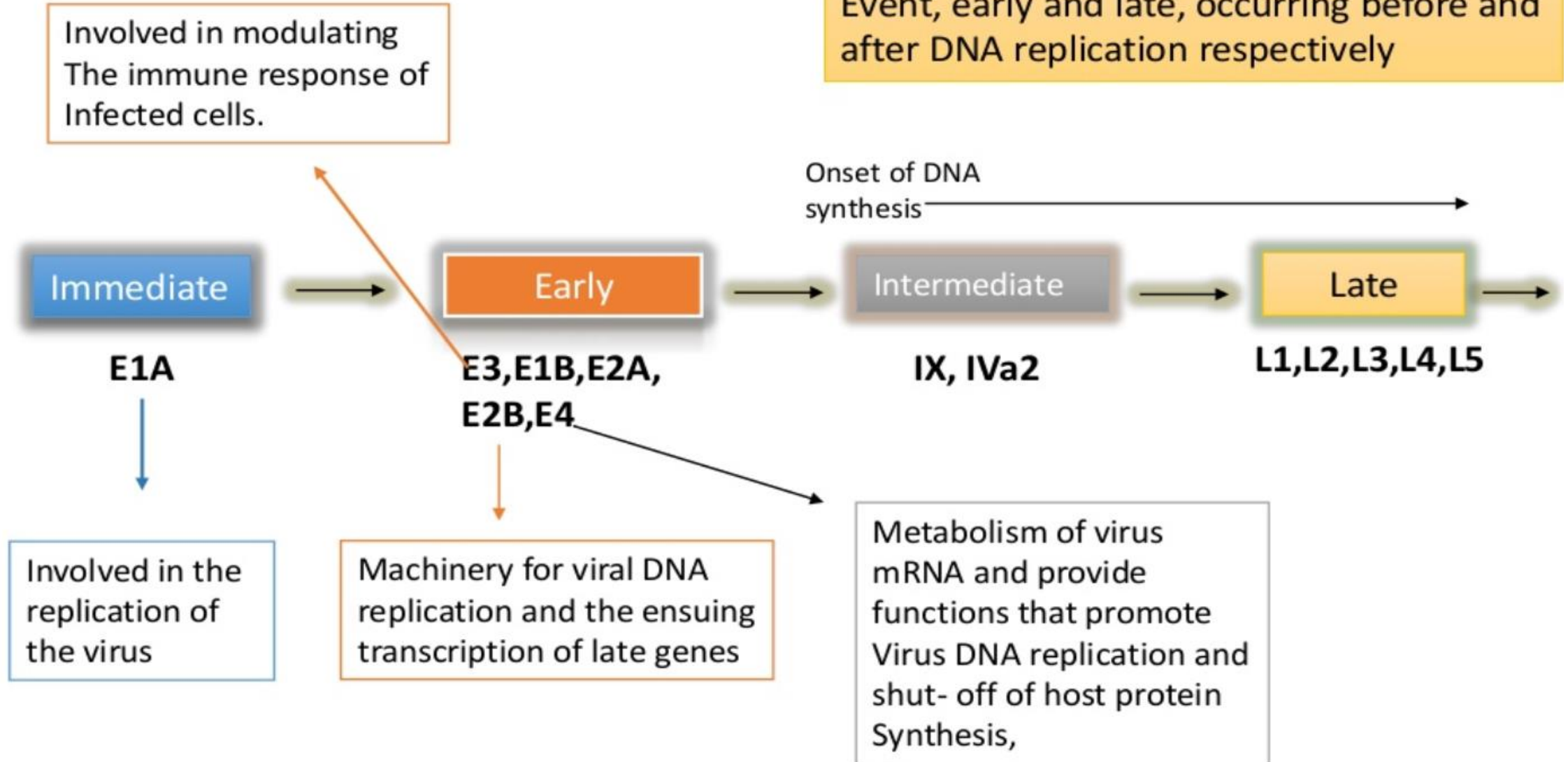
Тіршілік циклі



- Аденовирус өзінің фибриллалары арқылы коксаки-аденовирустық рецептормен байланысады
- Эндоцитоз арқылы клетка ішіне енеді, эндосома арқылы.
- Эндосома рН-ы қышқылданады, ол вирустың протеазаларын белсенді күйге көшіреді. Олар вирустың фибраларын ыдыратып, вирусты шешіндіре бастайды.
- Содан соң, қожайын клеткалардың микрофибриллаларын пайдаланып жылжып ядроға жетеді де, клетканың ядросына ДНҚ-сын енгізеді.
- Ары қарай транскрипция, трансляция және репликация процесстері жүзеге асады.
- Нәтижесінде, бір вирустан бірнеше мыңдаған ұрпақ пайда болады.
- Аденовирус респираторлық жолмен таралады, көбіне ас қорыту жүйелерін инфекциялайды.

Genome organization of Virus

Adenovirus replication is a two phase Event, early and late, occurring before and after DNA replication respectively



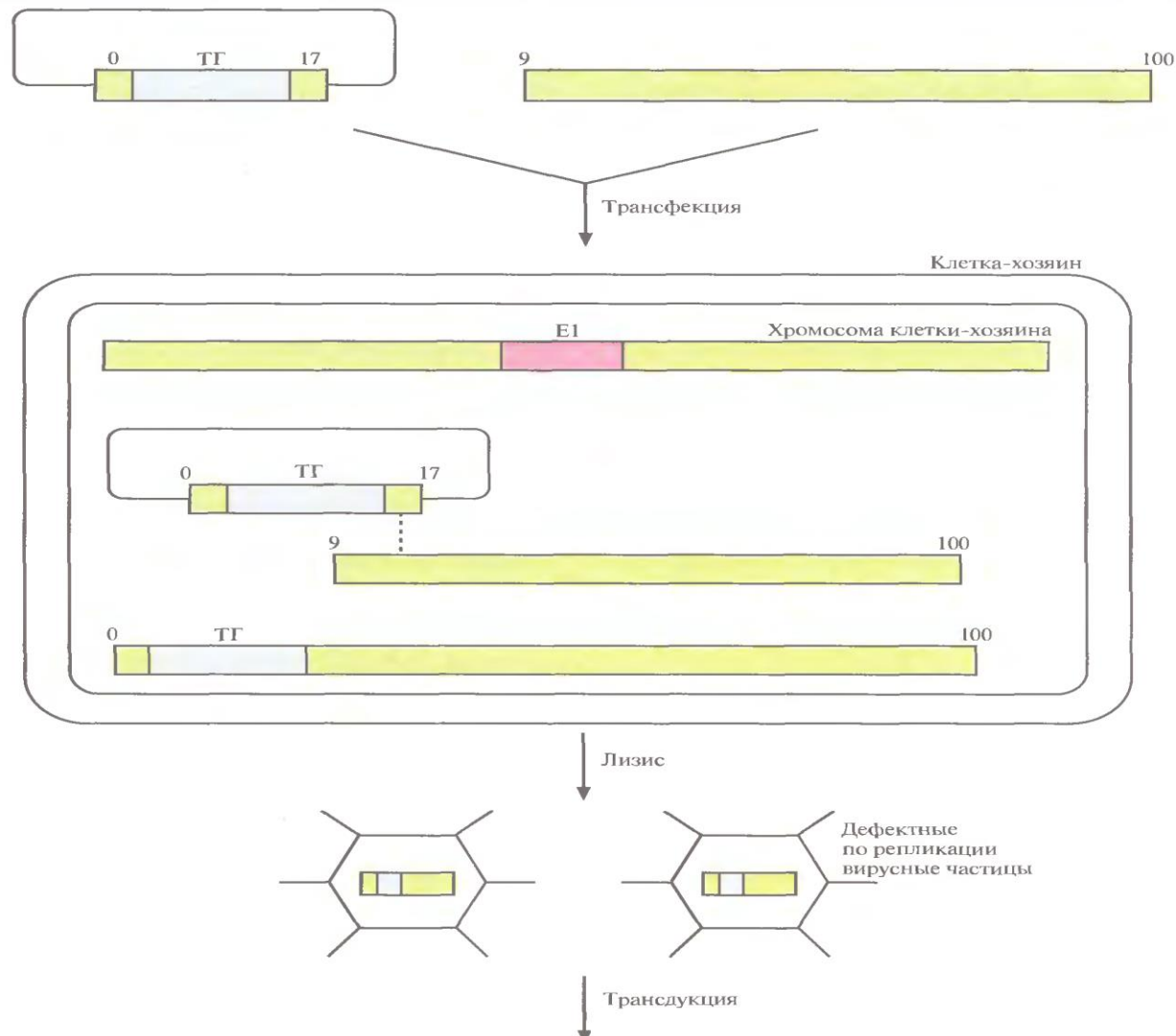
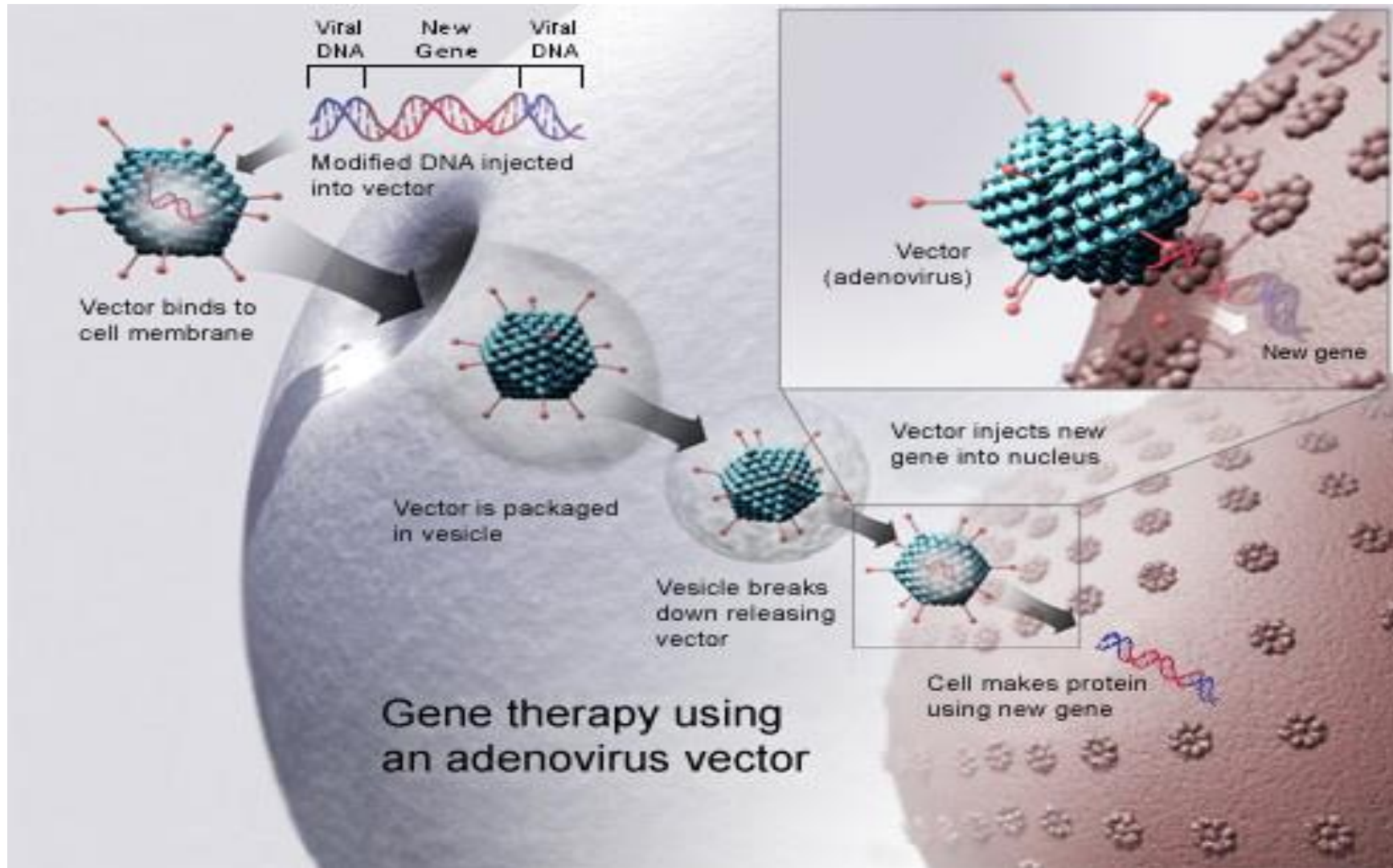
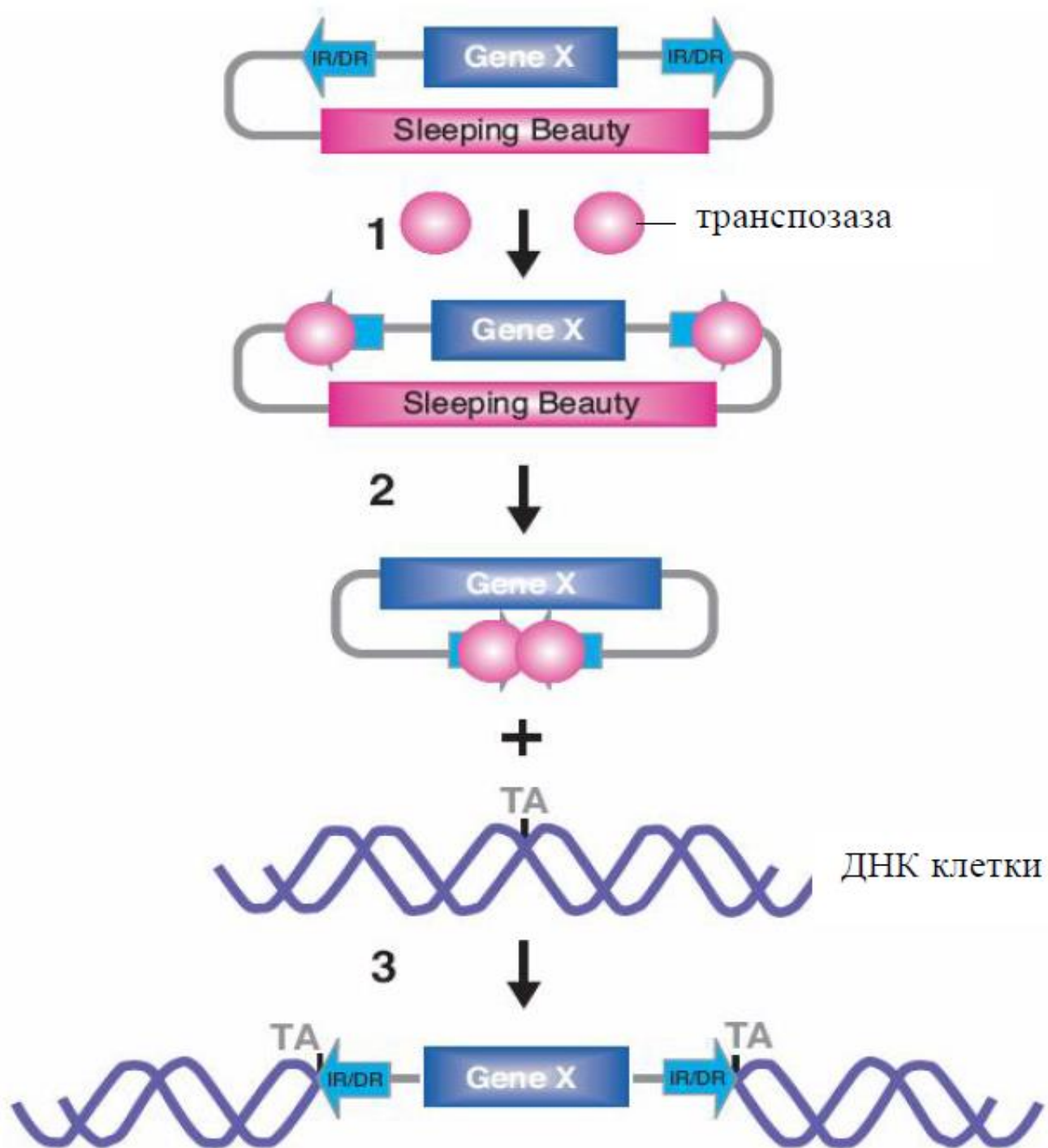


Рис. 21.7. Аденовирусный вектор. В клетку-хозяина, несущую интегрированный в геномную ДНК функциональный ген E1 аденовируса, вводят встроенную в сегмент аденовирусного генома (0–17 единицы карты) плазмиду с «терапевтическим» геном (ТГ) и участок геномной ДНК аденовируса (9–100 единицы карты). Длина генома аденовируса равна 100 единицам. В результате рекомбинации (штриховая линия) между перекрывающимися участками плазмиды и ДНК аденовируса образуется молекула ДНК, эквивалентная полноразмерному вирусному геному. Рекомбинантная ДНК, содержащая «терапевтический» ген, упаковывается и высвобождается из клетки после лизиса. Образующиеся вирусные частицы дефектны по репликации. Плазмидная ДНК, входящая в состав конечной генетической конструкции, не влияет на упаковку рекомбинантной ДНК (не показано).

Аденовирус векторын қолданатын ген терапиясы.



- Аденовирус векторын қолданатын ген терапиясы. Кейбір жағдайларда аденовирус жаңа генді жасушаға кіргізеді. Егер емдеу сәтті болса, жаңа ген ауруды емдеу үшін функционалдық ақуызды жасайды.



• 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.

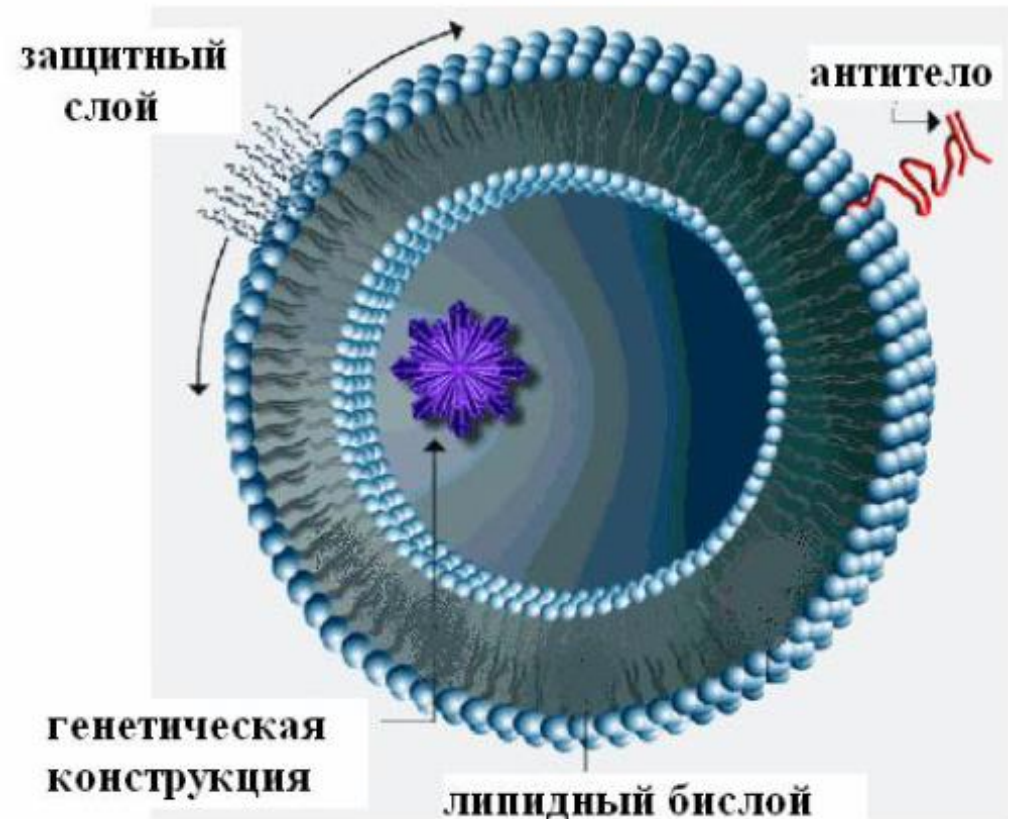
Липосомалардың көмегімен генді тасымалдау

Липосомалар – бір немесе бірнеше бикабатты мембранадан түзілген микроскопиялық фосфолипидтік везикулалар, олар химиялық препараттарды, белоктарды, пептидтерді, ДНҚ, антиметаболиттерді 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.



• ДНҚ құрылымды нысана жасушаға трансфекцияның физикалық әдістері

- **Электротрансфекция.** 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.



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 тастау мақсатында қолданылады.

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

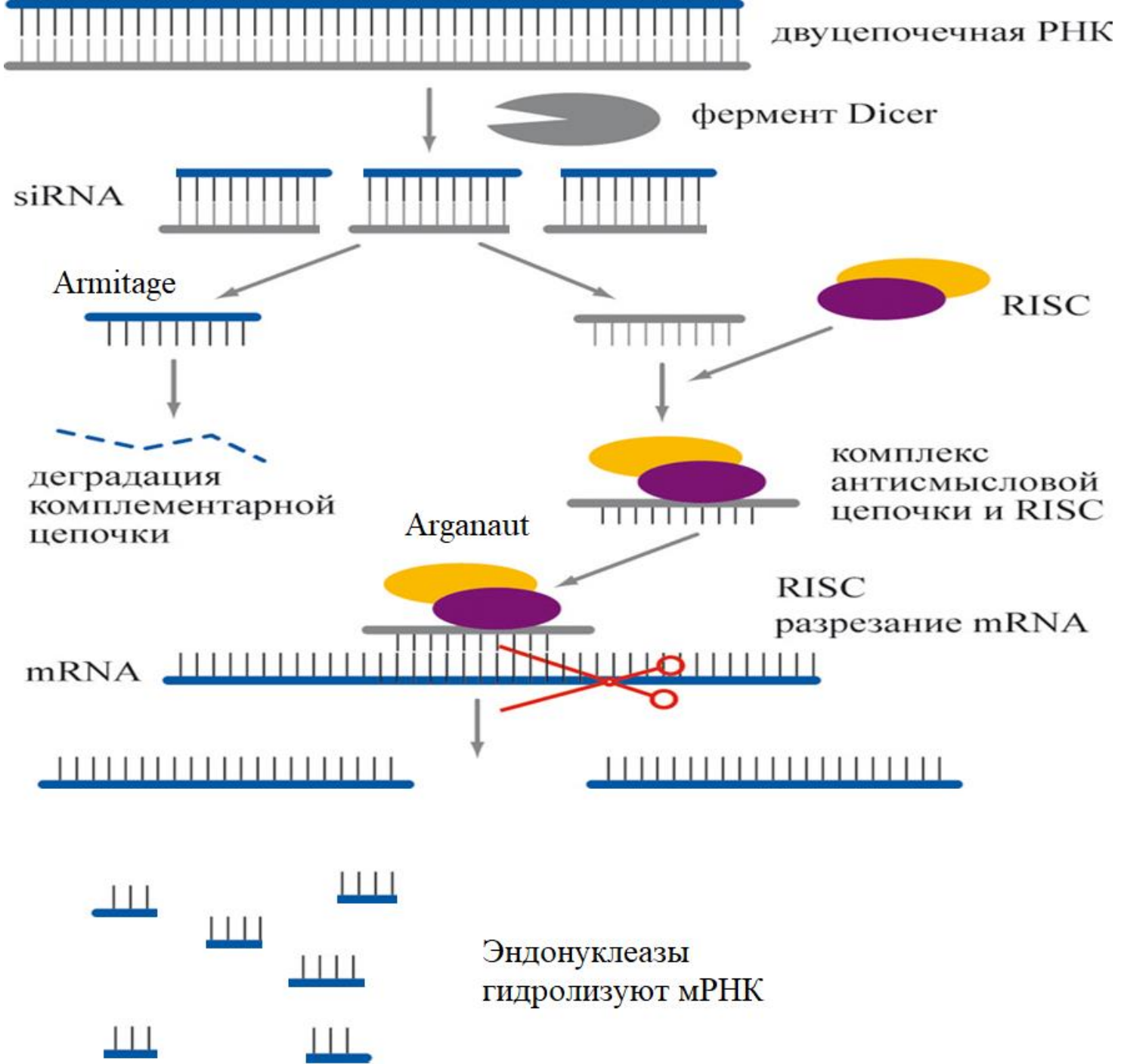
- мРНК деңгейінде ген экспрессиясын басып тастаудың тағы бір әдісі болып ферментативтік қасиетке ие РНК рибозимдерді пайдалану табылады.
- Гендік терапияда рибозимдерді пайдаланудың артықшылығын мынадан байқауымызға болады, яғни антимағыналы РНК-мен салыстырғанда жасушаға сол бір мРНК-ны ыдыратуға бағытталған 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 көздері:

- 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.



РНК 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.