

Генетическая (генная) инженерия

В литературе используются два термина - генетическая инженерия и генная инженерия. Поэтому в ответе можно использовать оба варианта.

В медицине генная инженерия используется для решения двух основных задач.

1) Получение препаратов для лечения и профилактики заболеваний. Используются клетки бактерий, грибов, млекопитающих.

2) Генотерапия - введение в клетки человека нормальной копии гена.

Генетическая инженерия представляет собой большой комплексный раздел генетики, в который входят различные вопросы молекулярной биологии, работа с культурами клеток, выделение и очистка биологически активных веществ и так далее. В представленном материале будут представлены только основные моменты работы с рекомбинантными ДНК. Студенты должны понимать этапы проведения генно-инженерных манипуляций, особенности работы с клетками прокариотов и эукариотов, достижения генной инженерии в области медицины.

Для начала рассмотрим несколько определений.

Генетическая инженерия (генная инженерия) – это современная область биотехнологических исследований, направленная на получение организмов с новыми заданными свойствами посредством рекомбинаций молекул ДНК.

Генная инженерия - это совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма, осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы. Цель этих приёмов - добиться изменения наследственного, генетического аппарата клетки.

Генетическая инженерия – это конструирование искусственным путем функционально активных генетических структур и наследственно измененных организмов.

Генетическая инженерия – это направленная модификация биообъектов в результате введения искусственных генетических программ.

Генная инженерия - это совокупность процедур, позволяющих осуществлять перенос генетического материала из одного организма в другой.

Генная (генетическая) инженерия представляет собой комплекс методов, которые позволяют создать искусственную генетическую конструкцию, ввести эту конструкцию в организм и обеспечить ее функциональную активность.

Основные этапы генно-инженерных работ

1) Получение гена, кодирующего необходимый признак.

2) Создание искусственной генетической конструкции - включение гена в вектор для переноса в клетку-реципиент.

3) Перенос вектора, содержащего нужный ген и регуляторные элементы в изменяемую клетку или организм.

4) Идентификация и отбор клеток, которые получили нужный ген и у

которых проявился необходимый признак.

В генной инженерии широко используются два типа ферментов - рестриктазы и лигазы. Рестриктазы относятся к группе эндонуклеаз, то есть они способны разрезать молекулу ДНК в середине. Рестриктазы опознают определенную последовательность нуклеотидов (или сайт рестрикции), активируются и разрушают фосфодиэфирные связи между нуклеотидами в определенном участке цепи. Сегодня используется около 600 различных рестриктаз. ДНК-лигазы способны формировать фосфодиэфирные связи между нуклеотидами. Эти ферменты соединяют (часто говорят сшивают) фрагменты ДНК в одну молекулу.

Способы получения генов

1. Выделение гена из ДНК.

Изолированную ДНК подвергают расщеплению рестриктазами с последующим отделением нужного фрагмента. Для этого необходимо знать структуру нужного участка ДНК и определить наличие сайтов рестрикции. Возможные проблемы связаны с трудностью подбора рестриктаза для выделения именно нужного фрагмента ДНК. Полученные фрагменты часто содержат «лишние» последовательности нуклеотидов. В нативных молекулах ДНК может содержаться несколько сайтов рестрикции для использованных ферментов, поэтому может формироваться несколько фрагментов ДНК. Из смеси фрагментов нужно будет выделить нужный ген.

2. Копирование гена методом ПЦР.

Удобно и быстро, есть возможность копирования строго определенной последовательности. Для этого необходимо знать структуру гена и подобрать праймеры к участкам ДНК, которые находятся на границе нужного гена.

3. Синтез гена на основе изолированной матричной РНК. Для этого используется фермент РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза). На основе мРНК синтезируется одна цепь нуклеотидов ДНК. Затем ДНК-зависимая ДНК-полимераза на основе принципа комплементарности синтезирует вторую цепь ДНК. Известно, что зрелая мРНК после завершения сплайсинга содержит только экзоны. Поэтому полученный ген не содержит интронов. Такая ситуация удобна при работе с бактериями, поскольку гены прокариотов лишены интронов и сплайсинг у них не происходит.

4. Синтез генов *de novo* («с нуля») с помощью химико-ферментативных методов. Для этого необходимо знать строение нужного гена. Возможен и другой вариант. Определяем строение целевого белка. С учетом генетического кода составляем последовательность нуклеотидов ДНК. Затем синтезируем нужный ген. В этом случае синтезированный фрагмент ДНК также будет содержать только экзоны.

Необходимо помнить, что наличие гена-мишени недостаточно для решения всех задач. Мы должны получить функционирующую генетическую конструкцию, то есть необходима транскрипция гена и синтез соответствующего белка. Таким образом, необходимо наличие регуляторных

элементов. В создаваемую генетическую конструкцию необходимо включить промотор для гена и терминатор. Возможно включение и других регуляторных элементов (энхансеры, сайленсеры и другие).

Характер дальнейших действий зависит от характера клетки-реципиента.

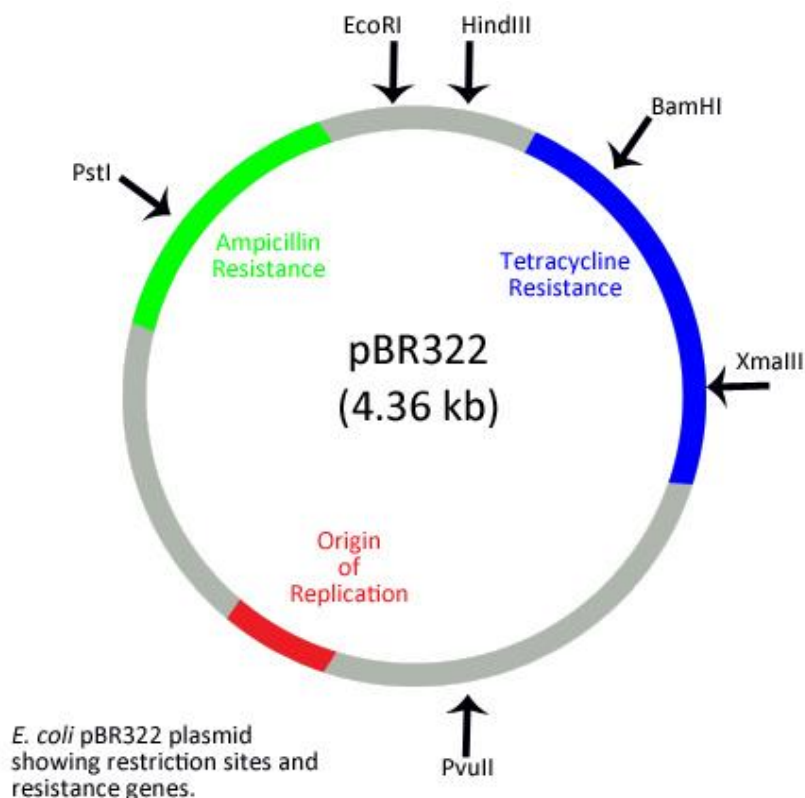
Работа с бактериями

Бактерии широко применяются для производства белков, используемых в медицинских целях.

2) Создание искусственной генетической конструкции - включение гена в вектор для переноса в клетку-реципиент.

Вектор — это искусственная конструкция, которая используется для переноса генетического материала в клетку-реципиент и, как правило, способная к саморепликации.

Для бактерий в качестве вектора часто используют плазмиды. Плазмиды представляют собой небольшие кольцевидные молекулы ДНК, находящиеся в цитоплазме клетки отдельно от нуклеоида. Плазмиды способны переносить в клетку небольшую вставку (до 10 тысяч пар нуклеотидов). В настоящее время синтезированы тысячи плазмид, которые можно использовать в генной инженерии. В плазмиду часто вносят гены маркеры, которые позволяют обнаружить клетки, содержащие эту плазмиду.



На рисунке представлена структура искусственной плазмиды

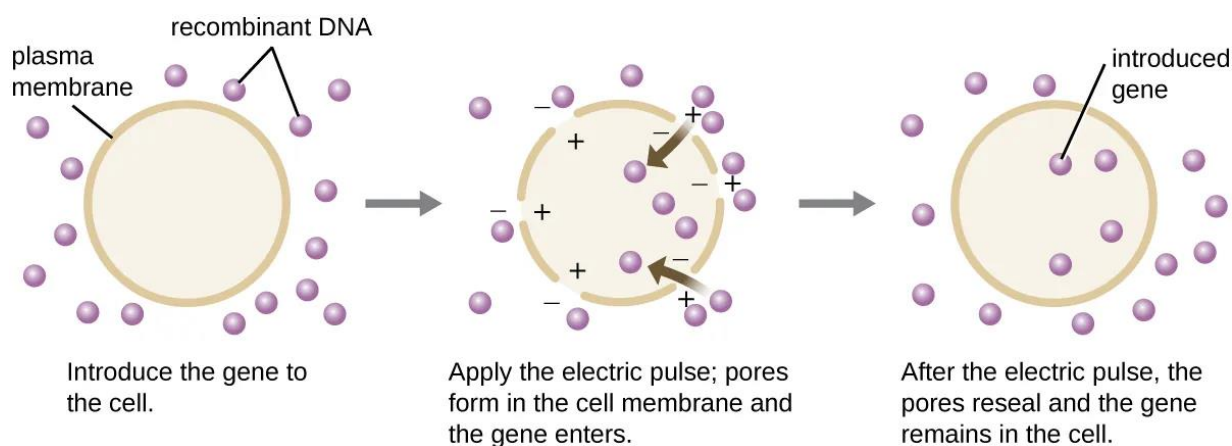
Плазмида содержит 4362 пары нуклеотидов. В ней есть участок начала репликации *ori* (Origin of replication). Поэтому плазмида может обеспечивать синтез ДНК и размножаться в *E. Coli*. Плазмида содержит гены устойчивости к двум антибиотикам — ампициллину и тетрациклину. Это можно использовать для обнаружения клеток, содержащих эту плазмиду. В плазмиде более 40 сайтов рестрикции для различных рестриктаз (часть из них отмечены стрелками на рисунке). Это позволяет разрезать плазмиду и вносить в нее искусственные генетические конструкции.

3) Перенос вектора, содержащего нужный ген и регуляторные элементы в изменяемую клетку или организм.

Назовем два основных метода, которые позволяют внедрить созданную плазмиду в клетку.

А) Бактерии обрабатывают CaCl_2 , добавляют плазмиды и кратковременно нагревают до 42°C (подвергают тепловому шоку). Такое воздействие вызывает фазовый переход липидов мембраны из двухслойного состояния в необычное гексагональное состояние. Этот фазовый переход сопровождается быстрым поглощением экзогенных молекул ДНК (в том числе созданных нами плазмид).

Б) Электропорация.



Бактерии помещают в среду, содержащую плазмиды. Кратковременно (10- 20 миллисекунд) действуют током с напряжением 200 - 300 вольт. В мембране клеток создаются поры. Под действием осмоса (по градиенту концентрации) плазмиды поступают в цитоплазму клетки. Клетка при этом набухает. После прекращения действия электромагнитного поля целостность мембраны восстанавливается и плазмида остается в клетке. Часть клеток погибает. От 60% до 80% выживших клеток содержат плазмиды.

Обратите внимание, что метод электропорации универсальный. Он позволяет работать как с клетками прокариотов, так и с клетками эукариотов.

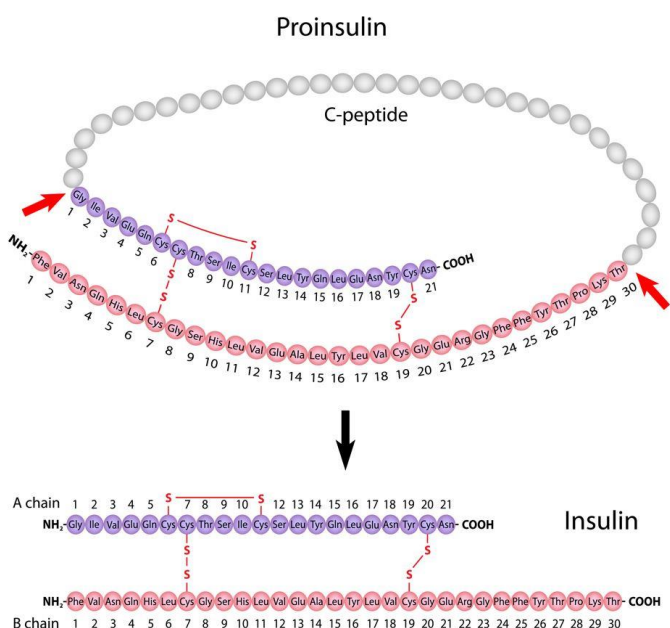
) Идентификация и отбор клеток, которые получили нужный ген и у которых проявился необходимый признак.

Как правило отбор проводится в 2 этапа. Сначала определяем наличие плазмид в клетках. В качестве примера рассмотрим работу с плазмидой pBR322. Плазмида содержит гены, кодирующие устойчивость к ампициллину и тетрациклину. Модифицированные клетки выращиваем на питательной среде, содержащей один из этих антибиотиков. Бактерии, устойчивые к антибиотику, размножаются и формируют колонии. Эти бактерии содержат плазмиду. В дальнейшем определяют наличие и активность нужного нам гена. Можно использовать ПЦР. Из бактерий выделяют ДНК и подбираем праймеры, комплементарные к границам гена-мишени (или к фрагменту гена). Положительный результат указывает на наличие нужного гена в клетках. Далее бактерии культивируют и определяют наличие в среде нужного нам белка. Наиболее продуктивные штаммы отбирают и используют в производстве белков.

Производство белков является весьма сложным процессом. Продукт нужно выделить из питательной среды, очистить от примесей, довести до нужной концентрации и так далее.

Нужно упомянуть об еще одной проблеме. В клетках эукариотов практически все белки проходят посттрансляционные модификации. Это приходится учитывать при производстве нужных веществ.

В качестве примера рассмотрим инсулин. Клетка вырабатывает большой белок - проинсулин, от которого специальный фермент отделяет фрагмент, который называют С-пептидом. В результате такой обработки образуется инсулин и С-пептид.



При получении первых вариантов генно-инженерного инсулина разные штаммы *E. coli* продуцировали А и В цепи инсулина. Белки очищали, инкубировали при определенных условиях, формировались дисульфидные связи и появлялась молекула инсулина. В настоящее время бактерии вырабатывают проинсулин, белок обрабатывают ферментами и формируется инсулин.

Работа с клетками человека.

1) Получение гена, кодирующего необходимый признак.

Этот этап описан выше.

2) Создание искусственной генетической конструкции - включение гена в вектор для переноса в клетку-реципиент.

Чаще всего в качестве вектора используются вирусы. Вирус с помощью рецепторов взаимодействует с клеткой-мишенью. Взаимодействие рецепторов определяет тропность вируса (способность проникать в клетки определенных тканей). Избирательность действия вируса не абсолютна. Тропность позволяет ограничить виды клеток, с которыми взаимодействует вирус. После проникновения в клетку вирус теряет капсид и нуклеиновая кислота вируса проникает в ядро.

На сегодняшний день предложен целый ряд вирусных векторов для эффективной трансдукции генетического материала на организменном уровне, каждый имеет свои достоинства и недостатки. Наибольшее развитие получили векторы на основе аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вируса простого герпеса, ретровирусов и лентивирусов. Они различаются по характеру клеток-мишеней, размеру переносимой генетической конструкции, интенсивности иммунного ответа на вирус.

Нужно выделить аденоассоциированные вирусы (ААВ). Они не могут размножаться, если в клетке-мишени не находится еще один вирус (например - аденовирус). Эти вирусы не являются патогенными для человека. Содержат одноцепочечную ДНК, что облегчает работу с генетическим материалом. ААВ имеют несколько серологических вариантов, которые различаются антигенами и тропностью к различным клеткам человека. Эта особенность позволяет подобрать вариант вируса для действия на заданные клетки-мишени. При проникновении в клетку многие ААВ не встраиваются в хромосому, а формируют в ядре самостоятельную кольцевую молекулу ДНК. Такую структуру называют эписомой. Эта особенность снижает риск отрицательных последствий генотерапии. Эписомы долго сохраняются в неделящихся клетках и обеспечивают экспрессию внедренного гена. В 2026 году оба зарегистрированных в России генно-инженерных препарата (золгенсма и лукстурна) созданы на основе ААВ.

При создании вектора генетический материал вируса удаляется частично или полностью. В вектор внедряют нужный ген. В данном случае часто используют конституитивные промоторы. Обычно для взаимодей-

ствия промотора с РНК-полимеразой и активации фермента нужны факторы транскрипции. Конституитивный промотор самостоятельно обеспечивает активацию РНК-полимеразы. Эта особенность позволяет получить высокий уровень экспрессии внедренного генетического материала.

3) Перенос вектора, содержащего нужный ген и регуляторные элементы в изменяемую клетку или организм.

Полученный вектор вводят человеку. Способ введения зависит от характера клеток-мишеней.

Достижения генной инженерии (препараты, которые используются в практике здравоохранения)

Препарат **Лукстурна** представляет собой препарат генной терапии. Применяется для лечения взрослых и детей с потерей зрения в результате наследственной дистрофии сетчатки, вызванной мутациями гена RPE65. Эти мутации препятствуют выработке в организме необходимого для зрения белка, приводя к снижению зрения и возможной слепоте. Действующее вещество препарата представляет собой измененный ААВ, содержащий рабочую копию гена RPE65, который после инъекции доставляет этот ген в клетки сетчатки. Это дает сетчатке возможность производить белки, необходимые для зрения. Применяемый для доставки генов вирус не вызывает заболеваний человека. Использован промотор CAG. Это синтетический гибридный промотор, который используется для высокой и повсеместной экспрессии трансгенов в клетках млекопитающих. Название «CAG» дано по имени трёх основных компонентов: раннего энхансера цитомегаловируса (CMV), промотора куриного β -актина (CBA) и акцептора сплайсинга гена β -глобина кролика. Препарат Лукстурна назначают только в том случае, если результаты генетического исследования покажут, что снижение зрения обусловлено мутациями в гене RPE65.

Золгенсма — это генотерапевтический препарат, предназначенный для введения функциональной копии гена выживания моторных нейронов 1 (SMN1) в трансдуцированные клетки для устранения моногенной первопричины спинальной мышечной атрофии (СМА). Ожидается, что благодаря внедрению в моторные нейроны альтернативного источника экспрессии белка SMN, препарат обеспечит выживание и корректное функционирование трансдуцированных моторных нейронов.

Золгенсма представляет собой не реплицирующийся рекомбинантный аденоассоциированный вирусный вектор, который использует капсид аденоассоциированного вируса серотипа 9 (AAB9) для доставки стабильного, полностью функционального трансгена человеческого SMN. Установлено, что капсид AAB9 способен проникать через гематоэнцефалический барьер и трансдуцировать моторные нейроны. Ген SMN1, содержащийся в препарате, предназначен для того, чтобы персистировать в ядре трансдуцированных клеток в виде эписомальной ДНК. Предполагается, что он будет стабильно экспрессироваться на протяжении длительного

времени в постмитотических клетках. Способность вируса AAV9 вызывать заболевание у человека неизвестна. Трансген вводится в клетки-мишени в виде самокомплементарной двухцепочечной молекулы. Экспрессия трансгена регулируется конститутивным промотором (гибрид промотора гена куриного Р-актина и энхансера транскрипции цитомегаловируса), который обеспечивает постоянную и устойчивую экспрессию белка SMN.

Инсулин

Фолликулостимулирующий гормон человека (препарат Примапур)

Рекомбинантный альбумин человека. Активная фармацевтическая субстанция изготовлена из рекомбинантного инженерного штамма дрожжей *Pichia Pastoris* с высокой экспрессией человеческого альбумина и получена в результате ферментации, препаративного выделения, грубой и тонкой очистки, включая аффинную хроматографию, ультрафильтрацию, концентрирование.

Эти три препарата производятся в Свердловской области на заводе «Медсинтез».

Гормон роста

Интерферон-альфа

Интерферон-гамма

Эритропоэтин

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека

Фактор свертывания крови VIII человеческий рекомбинантный

Вакцина против гепатита В. Представляет собой препарат на основе поверхностного антигена вируса гепатита В, полученного методом рекомбинации ДНК на культуре дрожжей, трансформированных путем включения в их геном гена, кодирующего поверхностный антиген вируса гепатита В.

Вакцина Гардасил. Квадривалентная вакцина против вируса папилломы человека (ВПЧ). Вакцина представляет собой смесь высокоочищенных вирусоподобных частиц рекомбинантного основного капсидного белка (L1) ВПЧ типов 6, 11, 16 и 18. Белки L1 продуцируются путем раздельной ферментации в рекомбинантных клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и образуют вирусоподобные частицы путем самосборки. Вирусоподобные частицы для каждого типа очищаются и адсорбируются на алюминий содержащем адъюванте (аморфный гидроксифосфатсульфат алюминия). Используют для профилактики заболеваний, вызываемых вирусом папилломы человека типов 6, 11, 16 и 18. К ним относятся рак шейки матки, вульвы и влагалища; генитальные кондиломы.

Омализумаб, Генолар. Это рекомбинантные моноклональные IgG антитела, которые селективно связываются с IgE человека. Получают по технологии рекомбинантной ДНК в системе для экспрессии, представленной клетками яичников китайского хомячка. Используют в лечении бронхиальной астмы.

Инфликсимаб, этанерцепт, тоцилизумаб -для лечения ювенильного идиопатического артрита, ревматоидного артрита.

Тоцилизумаб рекомбинантное моноклональное антитело к человеческому рецептору интерлейкина-6 (ИЛ-6) из подкласса IgG. Антитела производятся с использованием клеток млекопитающих (клеток яичника китайского хомячка). Тоцилизумаб связывается рецепторами ИЛ-6 ингибирует опосредованную ИЛ-6 передачу сигналов через эти рецепторы.

Этанерцепт. Представляет собой гибридную димерную белковую молекулу, состоящую из рецептора фактора некроза опухоли (ФНО), соединенную с Fc фрагментом человеческого IgG1. Продуцируется с применением технологии рекомбинантной ДНК на клетках яичников китайского хомячка. Этанерцепт является конкурентным ингибитором связывания ФНО с его рецепторами на поверхности клетки, и, таким образом, ингибирует биологическую активность ФНО.

Инфликсимаб. Химерные мышино-человеческие IgG моноклональные антитела, состоящие из вариабельной (Fv) области мышинных моноклональных антител к фактору некроза опухоли-альфа и фрагмента молекулы IgG человека. Связывается с фактором некроза опухоли-альфа и снижает его функциональную активность.

Ритуксимаб. Генно-инженерное химерное мышино-человеческое моноклональное антитело IgG к антигену CD20. Антиген CD20 экспрессируется на поверхности В-лимфоцитов. При связывании с CD20 ритуксимаб вызывает лизис В-клеток. Противоопухолевое средство.

Литература

Абрамова З.И. Введение в генетическую инженерию: Учебное пособие для самостоятельной внеаудиторной работы студентов по курсу «Генная инженерия» /З.И.Абрамова. - Казань: Казанский университет, 2008.- 168 с.

Апарцин Е.К. Методы доставки генетического материала в клетки и возможности их применения в генной терапии / Е.К. Апарцин, Н.Ю. Кнауэр // Гены и клетки. - 2016. - Т. XI, № 2. - С 32 - 41.

Балохин С. Д. Синтез инсулина путем генной инженерии и применение его в медицине / С. Д. Балохин, О. А. Гнездилова, Д. А. Мазовка, А. Т. Осинина // Вестник Челябинского государственного университета. Образование и здравоохранение. 2021. № 4 (16). С. 41—46.

Гончаренко Г. Г. Основы генетической инженерии. Методическое пособие. – Гомель: УО «ГГУ им. Ф.Скорины», 2003. – 118 с.

Егорова Т.В. Генная терапия наследственных заболеваний на основе аденоассоциированных вирусных векторов: современные проблемы применения и пути их решения / Т.В. Егорова, А.А. Пискунов, Д.А. Потеряев // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2024. - Т. 24, № 2. - С. 123–139.

Епифанова Е.А. Вирусные векторы для доставки генетического материала в клетку и их использование в нейробиологии / Е.А. Епифанова, Е.В. Борисова, В.А. Салина, А.А. Бабаев // Современные технологии в медицине. - 2017. - Т. 9, № 1. - С. 162 - 174.

Каледа М.И. Лечение системного варианта ювенильного идиопатического артрита с применением генно-инженерных биологических препаратов в клинической практике / М.И. Каледа, И.П. Никишина // Педиатрия. - 2015. - Т. 94, № 2. - С. 116-125.

Карабельский А.В., Падкина М.В. Рекомбинантные интерфероны-альфа человека пролонгированного действия // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2007. - сер. 3, Вып. 4. - С. 45-53.

Кригер О.В., Основы генетической инженерии– СПб: Университет ИТМО, 2023. – 59 с.

Сетевое издание «Регистр лекарственных средств России РЛС» (доменное имя сайта: rlsnet.ru)

Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: учебно-справочное пособие. - Новосибирск: Сиб. унив. издательство, 2008. - 514 с.