



ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Векторы – как носители для
доставки генов. Основные
типы и принципы действия
векторов.

Основные этапы молекулярной биологии.

- **Первый романтический** период 1935–1944 гг. Макс Дельбрюк и Сальвадор Лурия занимались изучением репродукции фагов и вирусов, представляющих собой комплексы нуклеиновых кислот с белками. В 1940 г. Джордж Бидл и Эдуард Татум сформулировали гипотезу – "Один ген – один фермент". Однако, что такое ген в физико-химическом плане тогда еще не знали.
- **Второй романтический** период 1944–1953 гг. Была доказана генетическая роль ДНК. В 1953 г. появилась модель двойной спирали ДНК, за которую ее создатели Джеймс Уотсон, Френсис Крик и Морис Уилкинс были удостоены Нобелевской премии.
- **Догматический** период 1953–1962 гг. Сформулирована центральная догма молекулярной биологии: Перенос генетической информации идет в направлении ДНК → РНК → белок. В 1962 г. был расшифрован генетический код.
- **Академический** период с 1962 г. по настоящее время, в котором с 1974 года выделяют генно-инженерный подпериод.
- **Основные открытия** в молекулярной биологии:
- **1928** г. – Ф. Гриффит обнаружил явление трансформации у *Streptococcus pneumoniae*.
- **1941** г. – Д. Бидл и Э. Татум выдвигают утверждение “Один ген – один фермент” на основе исследования аксотрофных мутантов *Neurospora crassa*.
- **1944** г. – О. Эвери, К. Мак Леод и М. Мак Карти в эксперименте показали, что трансформирующий фактор, открытый Ф. Гриффитом, представлен ДНК, а не белком.
- **1952** г. – Эксперимент А. Херши и М. Чейз, в котором доказана наследственная роль ДНК.
- **1953** г. – Дж. Уотсон и Ф. Крик описали структуру ДНК по результатам рентгено-структурного анализа, полученным Р. Франклин и М. Уилкинсом.
- **1956** г. – А. Корнберг выделил ДНК-полимеразу I из клеток *E. coli*.
- **1957** г. – Ф. Крик формулирует центральную догму молекулярной биологии.
- **1960** г. – А. Парде, Ф. Жакоб, Ж. Моно показывают необходимость синтеза РНК (и РНК) для экспрессии генов.
- **1960 – 1964** гг. – эксперименты по расшифровке генетического кода.
- **1970** г. – Х. Тёмин и Д. Балтимор независимо друг от друга открывают обратную транскриптазу ретровирусов.

Основные этапы молекулярной биологии.

- **Конец 60-х – начало 70-х гг.** – С. Линн, В. Арбер, Д. Натанс и Г. Смит проводят исследование рестрикционных ферментов бактерий *E. coli* и *H. influenzae*.
- **1972 г.** – в лаборатории Х. Гобинда Кораны синтезирован полноразмерный ген тРНК из отдельных нуклеотидов.
- **1972 г.** – П. Берг впервые, путём рестрикции и лигирования фрагментов ДНК, осуществил создание рекомбинантной молекулы ДНК.
- **1973 г.** – С. Коэн и Г. Бойер, используя рестриктазно-лигазный метод, получили рекомбинантные плазмиды и произвели трансформацию ими клеток кишечной палочки.
- **1976–1979 гг.** – получены коммерческие штаммы кишечной палочки, содержащие гены инсулина, соматостатина и гормона роста человека.
- **1977 г.** – Ф. Сэнгер разработал метод секвенирования ДНК, основанный на использовании терминирующих нуклеотидов.
- **1981–1982 г.** – получены мышь с чужеродными генами β -глобина и гормона роста, а также первые трансгенные растения (табак с генами антибиотикоустойчивости бактерий).
- **1983 г.** – К. Мюллис осуществил первую полимеразную цепную реакцию (ПЦР).
- **1994 г.** – получение рекомбинантного зелёного флуоресцирующего белка (GFP) медузы *Aequorea victoria*.
- **2003 г.** – завершение тринадцатилетнего международного проекта по секвенированию генома человека.
- **Конец 2000-х гг.** – появление новых методов получения рекомбинантной ДНК, не требующих рестрикции и лигирования.
- **2010 г.** – создание первых бактерий *Mycoplasma mycoides* с искусственным (химически синтезированным) геномом.
- **2010-е гг.** – широкое развитие методов редактирования геномной ДНК *in vivo*.

Понятие вектора. Характеристика основных генетических элементов про- и эукариотических клеток, претендующих на роль векторов.

Вектор — молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала внутрь клетки, в том числе в клетку живого многоклеточного организма *in vivo*.

Для введения рекомбинантной ДНК применяют два основных вектора: плазмиды, бактериофаги.

Плазмидные векторы

Плазмиды представляют собой внехромосомный генетический элемент в виде кольцевых молекул ДНК, содержащих 1–3% генома бактериальной клетки. Плазмиды есть у всех бактерий. Одни из них содержат информацию, обеспечивающую их собственный перенос из одной клетки в другую (F-плазмиды), другие – несут гены устойчивости к антибиотикам (R-плазмиды) или специфические наборы генов, ответственных за утилизацию метаболитов (плазмиды деградации). Каждая плазида содержит сайт начала репликации, без которого репликация плазмиды в клетке-хозяине невозможна. Если две или более плазмиды не могут сосуществовать в одной и той же клетке – они принадлежат к одной группе несовместимости. Плазмиды, относящиеся к разным группам несовместимости, беспрепятственно существуют в одной клетке независимо от числа копий. У некоторых микроорганизмов в одной клетке обнаружено до 10 разных плазмид, каждая из которых выполняла свои функции и относилась к своей группе несовместимости. Репликация плазмид идет независимо от репликации хромосом. Количество копий определяется регуляторной системой клетки. Бактериальный клон, содержащий такую плазмиду, можно сравнить с фабрикой по производству этого фрагмента.





Принципиально важно, что векторы (в частности, плазмидные) обладают характерными для них свойствами:

1. *Точка начала репликации (ori)* – последовательность нуклеотидов, с которой начинается удвоение ДНК. Если векторная ДНК не сможет удваиваться (реплицироваться), то необходимый лечебный эффект не будет достигнут, потому что она просто быстро расщепится внутриклеточными ферментами-нуклеазами, а из-за недостатка матриц будет в итоге образовано гораздо меньше молекул белка. Следует отметить, что эти точки специфичны для каждого биологического вида, то есть если векторную ДНК предполагается получать путём её размножения в культуре бактерий (а не просто химическим синтезом, что обычно гораздо дороже), то потребуются отдельно две точки начала репликации – для человека и для бактерий;

2. *Сайты рестрикции* – специфические короткие последовательности (чаще палиндромные), которые узнаются специальными ферментами (эндонуклеазы рестрикции) и разрезаются ими определённым образом – с образованием «липких концов». Эти сайты необходимы для того, чтобы сшить векторную ДНК (которая, по сути, является «болванкой») с нужными терапевтическими генами в единую молекулу. Такая сшитая из двух или нескольких частей молекула зовётся «рекомбинантной»; 3. Понятно, что нам желательно бы получить миллионы копий рекомбинантной молекулы ДНК. Опять-таки, если мы имеем дело с культурой клеток бактерий, то далее эту ДНК нужно выделить. Проблема заключается в том, что далеко не все бактерии проглотят нужную нам молекулу, некоторые не станут этого делать. Чтобы эти две группы всё-таки различить, в векторную ДНК вставляют *селективные маркёры* – участки устойчивости к определённым химическим веществам; теперь если в среду добавить эти самые вещества, то выживут только те, которые обладают устойчивостью к ним, а остальные погибнут.

Плазмидные векторы

Плазмидные векторы, как правило, создают методом генной инженерии, так как природные (немодифицированные) плазмиды лишены ряда обязательных для «высококачественного вектора» свойств:

- небольшого размера, так как эффективность переноса экзогенной ДНК в *E. coli* снижается при длине плазмиды более 15 тысяч пар нуклеотидов;
- наличия сайта рестрикции, в который осуществлена вставка;
- наличия одного или более селективных генетических маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рекомбинантную ДНК.

Вводят плазмиды в соматические клетки разными способами. Частота трансформации не бывает 100%-й, затем используют схемы отбора, позволяющие идентифицировать трансформированные клетки. В качестве маркеров плаزمиды могут содержать гены, определяющие устойчивость бактерии к антибиотикам. Вставка чужеродного (донорного) гена в маркерный ген приводит к инактивации последнего. Это позволяет отличать трансформированные клетки, получившие векторную плазмиду (утратившие устойчивость к антибиотику), от клеток, получивших рекомбинантную молекулу (сохранивших устойчивость к одному, но утративших устойчивость к другому антибиотику). Этот прием называется инактивацией маркера вставки. Для отбора трансформированных клеток, содержащих рекомбинантную ДНК (гибридную плазмиду), проводят тестирование на резистентность к определенным антибиотикам. Например, клетки, несущие гибридную плазмиду, устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрациклину (в маркерный ген которого и внедрена донорная ДНК). Процесс разделения геномной ДНК на клонируемые элементы и введения этих элементов в клетки-хозяева называется созданием геномной библиотеки (банка клонов, банка генов).

Все системы клонирования должны отвечать двум основным требованиям.

1. Наличие нескольких сайтов для клонирования.
2. Возможности достаточно простой идентификации клеток с рекомбинантными ДНК.

Обычно при выборе или разработке подходящего вирусного вектора руководствуются следующими характеристиками:

1. Емкость — длина ДНК целевого гена, который может быть помещен в вектор.
2. Селективность поглощения целевыми для данной терапии клетками и отсутствие экспрессии в тканях, где получаемый белок может вызвать токсичность (например, в сердце).
3. Продолжительность экспрессии гена.
4. Иммуногенность — влияние вектора на иммунный ответ.
5. Простота производства.
6. Возможность интеграции в ДНК клетки или способность существования в качестве стабильного элемента в ядре клетки без геномной интеграции.
7. Вероятность наличия у пациента антител против этого вектора в случае, если организм ранее встречался с подобным вирусом, — это снижает эффективность вектора.

Таким образом, идеальный вектор должен обладать:

- местами для удобного встраивания фрагментов ДНК;
- достаточной ёмкостью;
- селективными маркерами, позволяющими выявлять клетки с этим вектором — как «пустым», так и со «вставкой»;
- участками ДНК, обеспечивающими его поддержание в виде отдельного репликона либо интеграцию клонированного фрагмента в хозяйский геном;
- участками ДНК, обеспечивающими (если требуется) эффективную экспрессию встроенного гена в выбранном хозяине.

Для всех рутинных процедур молекулярного клонирования широко используется *E. coli* в качестве клетки-хозяина.

Клетки, способные поглощать чужеродную ДНК называются компетентными; компетентность *E. coli* повышают, используя специальные условия культивирования. Для получения больших количеств чужеродных белков с помощью рекомбинантных штаммов *E. coli* была сконструирована плазида, содержащая сильный промотор, селективный маркерный ген и короткий участок с несколькими уникальными сайтами для рестрицирующих ферментов – полилинкер.

Эффективными методами трансформации *E. coli* плазидами является **электропорация** (воздействие на клеточные мембраны электрическим током для увеличения их проницаемости).

Для введения клонированных генов в соматические клетки также применяют **микроинъекции, микроукалывания** или **слияние** с клеткой нагруженных ДНК **мембранных везикул (липосом)**.

Несмотря на сегодняшнее преобладание векторов на основе вирусов, гены можно доставлять и другими физическими и химическими методами: **генной пушкой, магнетофекцией, сонопорацией**, применением различных наночастиц (из кремния, золота, фосфата кальция, липидов) и др.

Физические методы доставки генетического материала.

Классическим физическим методом доставки генетического материала является т.н. «*генная пушка*», впервые примененная для переноса генов в растения. Метод основан на бомбардировке клеток или ткани металлическими частицами, покрытыми ДНК. Необходимая скорость придается частицам током газа-носителя (чаще всего, гелий) или путем высоковольтного электрического разряда. В качестве носителя используют микрочастицы золота, вольфрама или серебра диаметром порядка 1 мкм. Для достижения необходимой эффективности переноса генетического материала и воспроизводимости результатов необходима точная стандартизация всех физических и технических параметров эксперимента (размер частиц, давление газа и др.). В настоящее время генные пушки используют в исследованиях рака яичников. Очевидным недостатком генных пушек является травматизация тканей-мишеней, часто приводящая к гибели трансфицированных клеток.

Метод электропорации

Повысить проницаемость плазматической мембраны можно и электрическими разрядами. На этом основан *метод электропорации* – еще один классический физический метод переноса генов. Приложение к плазматической мембране электрического поля, большего, чем ее собственная электрическая емкость, вызывает перераспределение зарядов на мембране с последующим формированием пор, что позволяет молекулам ДНК диффундировать внутрь клеток. Параметры поля подбирают исходя из физических свойств мембраны клеток-мишеней.

Описана **внутрикожная, внутримышечная и внутриопухолевая** доставка плазмидной ДНК с помощью электропорации. Основным препятствием использования электропорации *in vivo* также является повышенная гибель клеток, подвергшихся действию электрического поля.

Метод сонопорации

Более щадящей техникой пермеабиллизации плазматической мембраны является *сонопорация* – обработка ткани-мишени ультразвуком.

Для доставки генетического материала в клетки методом сонопорации ДНК иммобилизуют на поверхности микропузырьков и вводят в кровоток с последующим приложением ультразвука в проекции органа-мишени. Пузырьки состоят из ядра (перфторуглеводороды или гексафторид серы), наполненного газом (воздух, азот, инертный газ) и покрытого липидами, белками или синтетическими биополимерам. Циркулирующие микропузырьки, по размерам близкие к эритроцитам (диаметр 2–4 мкм), отвечают на воздействие ультразвука и высвобождают ДНК, которая диффундирует в пермеабиллизованные клетки. Сонопорацию используют для доставки генетического материала в мозг, почки, брюшную полость, а также в мышечную ткань, включая сердечную мускулатуру, и др.

«Cell squeezing»

«Cell squeezing» – метод, изобретенный в 2013 г. Он позволяет доставить молекулы в клетки путём "мягкого сдавливания" клеточной мембраны. Метод исключает возможность токсичности или неправильного попадания по мишени, так как он не зависит от внешних материалов или электрических полей.

Метод гидропорации

В редких случаях для доставки генетического материала *in vivo* используют *гидропорацию* – повышение проницаемости мембраны за счет резкого изменения гидродинамического давления.

Давление создается инъекцией больших объемов растворов ДНК в короткий промежуток времени. Такое воздействие увеличивает проницаемость эндотелия капилляров и формирует поры в плазматической мембране окружающих клеток паренхимы, через которые проникает ДНК. Этот метод, как правило, используется для генной терапии клеток печени.

Микроинъекция ДНК

Микроинъекция ДНК – введение в ядро клетки с помощью тонких стеклянных микротрубочек ($d=0,1-0,5$ мкм).

Недостаток – сложность метода, высока вероятность разрушения ядра либо ДНК;

- можно трансформировать ограниченное число клеток;
- не используется для человека.

Методы на основе частиц.

Прямой подход к трансфекции – генная пушка, при этом ДНК сцепляют в наночастицу с инертными твердыми веществами (чаще золото, вольфрам), которая затем «выстреливает» направленно в ядра клеток-мишеней. Этот метод применяется *in vitro* и *in vivo* для введения генов, в частности, в клетки мышечных тканей, например, при таком заболевании, как миодистрофия Дюшена. Размеры частиц золота – 1-3 мкм.

Методы на основе частиц.

Очень эффективным методом для трансфекции ДНК является внедрение её через *липосомы* – малые, окруженные мембраной тельца, которые могут сливаться с клеточной цитоплазматической мембраной (ЦПМ), представляющая собой двойной слой из липидов.

Для эукариотических клеток трансфекция производится эффективнее с применением *катионных липосом*, потому что клетки к ним более чувствительны. Процесс имеет своё название – *липофекция*. Этот метод сегодня считается одним из самых безопасных. Липосомы нетоксичны и неиммуногенны. Однако, эффективность переноса генов с помощью липосом ограничена, поскольку внесенная ими ДНК в клетках обычно сразу же захватывается лизосомами и разрушается.

Методы на основе частиц.

Еще один метод – использование *катионных полимеров*, таких как диэтиламиноэтилдекстран (ДЭАЭ-декстран) или полиэтиленимин. Отрицательно заряженные молекулы ДНК связываются с положительно заряженными поликатионами, и этот комплекс далее проникает в клетку путём эндоцитоза. ДЭАЭ-декстран изменяет физические свойства плазматической мембраны и стимулирует поглощение этого комплекса клеткой.

Главный недостаток метода заключается в том, что ДЭАЭ-декстран в высоких концентрациях токсичен. Метод не получил распространения в генотерапии.

Доставка с помощью гистонов и других ядерных белков

Гистоны — обширный класс ядерных белков, выполняющих две основные функции: они участвуют в упаковке нитей ДНК в ядре и в эпигенетической регуляции таких ядерных процессов, как транскрипция, репликация и репарация.

Эти белки, содержащие много положительно заряженных аминокислот (Lys, Arg), в естественных условиях помогают компактно уложить длинную цепь ДНК в сравнительно небольшое ядро клетки.

Магнитофекция

Магнитофекция - метод, использующий силы магнетизма для доставки ДНК в клетки-мишени. Сначала нуклеиновые кислоты ассоциируются с магнитными наночастицами, а далее, под действием магнитного поля, частицы загоняются в клетку. Эффективность почти 100%-ная, отмечена явная нетоксичность. Уже через 10-15 мин частицы регистрируются в клетке — это гораздо быстрее других методик.

Импалефекция

Импалефекция (impalefection; "impalement", букв. "сажание на кол" + "infection") – метод доставки с применением наноматериалов, таких как углеродные нанотрубки и нановолокна. При этом клетки буквально протыкаются подстилкой из нанофибрилл. Приставка «нано» применяется для обозначения их очень маленьких размеров (в пределах миллиардных долей метра).

Naked RNA и DNA

Кроме этого, исследуют и возможность доставки «голых» нуклеиновых кислот (naked RNA и DNA). Такие способы доставки целевых генов теоретически могут иметь преимущества в сравнении с вирусами, поскольку их использование легче сделать массовым (векторы на основе наночастиц, например, значительно проще выпускать в промышленных масштабах), кроме того, риск генотоксичности и иммуногенности здесь потенциально тоже будет низким. Однако пока методы химической доставки генов менее специфичны и точны, чем доставка с помощью вирусов, и потому менее эффективны, а методы физического внедрения генов в клетки не могут применяться в терапии *in vivo*. До сих пор еще ни одно лекарство на базе невирусных способов доставки генов не было одобрено для использования у людей.

Векторы на основе бактериофагов

Использование **бактериофагов** в качестве носителей генетической информации основано на том, что рекомбинантный ген встраивается в геном вируса и в последующем реплицируется с генами вируса при размножении в инфицированной клетке-хозяина. С этой целью применяют бактериофаг λ – вирус с двухцепочечной ДНК, которая после проникновения в клетку смыкается в кольцо. Бактериофаг M-13 – вирус нитевидной формы с кольцевой замкнутой ДНК, которая в клетке превращается в двухцепочечную и реплицируется в клетках-потомках.

Векторы на основе бактериофагов

В поисках эукариотических систем экспрессии, для получения биологически активных белков, созданы **бакмиды** – экспрессирующие векторы на основе бакуловирусов для *E. coli* и клеток насекомых. Выход рекомбинантных бакуловирусов в такой системе повысился до 99%. Клетки насекомого, инфицированные бакуловирусами, синтезировали гетерологичный белок. Векторы на основе фага удобны для создания клонеток (банка генов), но не для тонких манипуляций с фрагментом ДНК. Для детального изучения и преобразования фрагменты ДНК переклонировывают в плазмиды.

Кроме указанных векторов в генной инженерии применяют **космиды** – **плазмиды**, несущие *cos*-участок (комплементарные липкие концы) ДНК фага λ . Наличие *cos*-участка позволяет производить упаковку ДНК в головку фага *in vitro*, что обеспечивает возможность их, введения в клетку путем инфекции, а не трансформации.

Фазмиды – гибриды между фагами и плазмидами – способны развиваться как фаг и как плазида. Уступая космидам по клонирующей емкости, фазмиды дают возможность отказаться от переклонирования генов из фаговых, в плазмидные векторы. Таким образом, для получения любого белкового продукта необходимо обеспечить правильную транскрипцию кодирующего его гена и трансляцию соответствующей мРНК. Для инициации транскрипции (синтеза РНК) в нужном сайте необходим промотор, для ее остановки терминирующий кодон. Для синтеза разнообразных белков, кодируемых клонированными генами, интенсивно используют обычные дрожжи *S. cerevisiae*; генетика этих одноклеточных организмов хорошо изучена. Рекомбинантные белки, синтезированные в системах экспрессии *S. cerevisiae*, применяют в качестве вакцин и лекарственных препаратов. Придавать новые свойства существующим белкам, создавать уникальные ферменты возможно, производя, специфические изменения с помощью плазмид или ПЦР. Клонированные гены позволяют получать белки, содержащие нужные аминокислоты в заданных сайтах. Внесение специфических изменений в кодирующие последовательности ДНК, приводящие к определенным изменениям в аминокислотных последовательностях, называется направленным мутагенезом

Недостатки генной терапии

Технологии генной терапии находятся в самом начале пути, поэтому они имеют огромный простор для улучшения. Ниже перечислены основные задачи, которые требуют решения:

- **сложность, трудоемкость, дороговизна** и, как следствие, — плохая масштабируемость технологии, из-за чего генные препараты пока что невероятно далеки от массовости (и не факт, что скоро к ней приблизятся);
- вытекающая из предыдущего пункта **заоблачная стоимость такого лечения**, из-за чего доступно оно лишь немногим;
- зачастую **серьезные нежелательные явления** нового типа, приводящие иногда даже к необратимым последствиям (вплоть до летального исхода). Впрочем, по мере накопления опыта, врачи уже учатся с ними справляться;
- **недостаточный период наблюдений за использованием генной терапии**, отсюда возникает неуверенность в долговременности ее эффекта, а также опасения о возможных отдаленных последствиях применения таких лекарств;
- **несовершенство технологии доставки целевых генов**: вирусные векторы, которые чаще всего используются, далеко не идеальны. Кроме упомянутых проблем с нецелевой интеграцией в геном (характерных для лентивирусных и γ -ретровирусных векторов), есть еще опасность активации иммунной системы (для векторов AAV), снижающая эффективность доставки целевых генов. При этом повторное введение вектора возможно не всегда.