

Федеральное агентство по образованию
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

Национальный проект «Образование»
Инновационная образовательная программа ННГУ. Образовательно-научный центр
«Информационно-телекоммуникационные системы: физические основы и
математическое обеспечение»

А.А. Бабаев, Г.П. Ежова, Н.А. Новикова, В.В. Новиков

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ: КОРРЕКЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

Учебно-методические материалы по программе повышения квалификации «Хранение и
обработка информации в биологических системах»

Нижний Новгород

2007

Учебно-методические материалы подготовлены в рамках инновационной образовательной программы ННГУ: Образовательно-научный центр «Информационно-телекоммуникационные системы: физические основы и математическое обеспечение»

Бабаев А.А., Ежова Г.П., Новикова Н.А., Новиков В.В. Генная терапия: коррекция генетической информации. Учебно-методический материал по программе повышения квалификации «Хранение и обработка информации в биологических системах». Нижний Новгород, 2007, 86 с.

В пособии изложены современные молекулярно-биологические и биоинформационные аспекты вопросов, связанных с разработкой и использованием в эксперименте и практике генной терапии. Представлены различные виды генной терапии, способы и пути достижения лечебного эффекта генных терапевтических конструкций (позитивная и негативная генная терапия), конкретные примеры применения генной терапии для лечения различных заболеваний, генные вакцины. Особое внимание уделено биоинформатике, базам данных по генным сетям, наследственным заболеваниям, созданным генетическим конструкциям и т.д. Пособие предназначено для повышения квалификации преподавателей биологических факультетов классических университетов, научных сотрудников, студентов, магистров и аспирантов, изучающих молекулярную биологию и биоинформатику.

© А.А. Бабаев, Г.П. Ежова, Н.А.Новикова, В.В. Новиков

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ. СТАНОВЛЕНИЕ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ..... | 4 |
| 1. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ: ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ..... | 6 |
| 1.1. Виды генной терапии | 6 |
| 1.2. Способы введения (доставки) терапевтических конструкций в организм..... | 7 |
| 2. ПУТИ ДОСТИЖЕНИЯ ЛЕЧЕБНОГО ЭФФЕКТА ГЕННЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ..... | 11 |
| 2.1. Позитивная генная терапия | 11 |
| 2.1.1. Коррекция гена на уровне хромосомной ДНК..... | 11 |
| 2.1.2. Внехромосомная экспрессия введенного гена | 18 |
| 2.2. Негативная генотерапия..... | 34 |
| 2.2.1. Подавление функции гена на уровне мРНК..... | 34 |
| 2.2.2. Подавление функции гена на уровне белка..... | 38 |
| 3. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ..... | 40 |
| 3.1. Генная терапия наследственных заболеваний | 48 |
| 3.2. Онкологические заболевания..... | 54 |
| 3.3. Генная терапия вирусных заболеваний | 61 |
| 3.4. Генная терапия других заболеваний..... | 72 |
| 4. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.... | 75 |
| 3.1. Полимеразная цепная реакция..... | 75 |
| 3.2. Информационные технологии | 81 |
| ЛИТЕРАТУРА | 85 |

ВВЕДЕНИЕ. СТАНОВЛЕНИЕ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Важнейшим результатом изучения генома человека явилось быстрое развитие нового направления – молекулярной медицины. Сегодня, благодаря ее возникновению можно получить информацию об особенностях структуры индивидуального генома (генетический паспорт), в том числе о генах предрасположенности к определенным генетически обусловленным заболеваниям.

Генетизация медицины привела к появлению нового направления в биомедицине – генной терапии, которое базируется на достижениях молекулярной биологии, генной и клеточной инженерии, а также новых информационных технологий.

Изначально под генной терапией понималось лечение наследственных заболеваний путем коррекции мутантных генов на уровне хромосомной ДНК. Однако сложность проблемы заставила ученых пересмотреть взгляды на методологию. К настоящему времени исследователи лишь «нащупали» подходы к такому решению проблемы (технология химеропластики). Ввиду сложности задачи корректировки генома, наибольшее распространение получили методы, основанные на введении в организм больного полноценных функционально активных (терапевтических) генов в составе плазмидной ДНК.

Концепция генной терапии появилась сразу после осознания механизмов трансформации клеток опухолеродными вирусами. Вирусы осуществляют стабильное внедрение своего генетического материала в геном клетки хозяина, и поэтому было предложено использовать их, как векторы для доставки желаемой генетической информации в клетки, чтобы в случае необходимости поправлять клеточные дефекты и лечить болезни генома.

Первые клинические испытания методов генной терапии были предприняты 22 мая 1989 года с целью генетического маркирования опухоль-инфильтрующих лимфоцитов в случае прогрессирующей меланомы.

Первым моногенным наследственным заболеванием, в отношении которого были применены методы генной терапии, оказался наследственный тяжелый иммунодефицит (ADR), обусловленный мутацией в гене аденозиндезаминазы. 14 сентября 1990 года под руководством Френча Андерсона в Бетесде (США) четырехлетней девочке, страдающей этим редким заболеванием, были пересажены ее собственные лимфоциты, предварительно трансформированные вне организма геном аденозиндезаминазы.

Лечебный эффект наблюдался в течение нескольких месяцев, после чего процедура была повторена с интервалом 3-5 месяцев. За три года терапии в общей сложности были проведены 23 внутривенные трансфузии трансформированных Т-лимфоцитов без видимых неблагоприятных эффектов. В результате лечения состояние пациентки настолько улучшилось, что она смогла вести нормальный образ жизни и не бояться случайных инфекций. 14 сентября 1990 года считается днем рождения реальной генной терапии.

Исторически генная терапия нацеливалась на лечение наследственных генетических заболеваний, но впоследствии поле ее применения расширилось. В настоящее время генная терапия стала рассматриваться как потенциально универсальный подход к лечению практически всего спектра заболеваний, начиная от инфекционных, включая так называемые болезни современного общества (рак, атеросклероз, диабет), и заканчивая классическими генетическими, наследственными заболеваниями.

В современном понимании генная терапия – это совокупность биомедицинских технологий лечения дефектов генов с помощью введения в организм генетических конструкций, способных восстановить или заменить дефектный ген, экспрессировать полноценный генный продукт или блокировать работу мутантных и чужеродных генов.

1. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ: ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ

1.1. ВИДЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

В генотерапии используют два основных подхода, различающихся природой клеточ-мишеней, и соответственно выделяют два вида генной терапии.

Фетальная генотерапия. При этом виде терапии генетическую конструкцию вводят в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития (введение генов *in utero*). Ожидается, что введенный материал попадет во все клетки реципиента (и даже в половые клетки, обеспечив тем самым передачу следующему поколению).

При эмбриональной генной терапии доставка терапевтического гена может быть осуществлена путем его введения в амниотическую полость. Это привлекательно с точки зрения контроля за самой процедурой с помощью различных способов, начиная от ультразвука и заканчивая амниоцентезом (пункция плодного пузыря) и анализом образцов хориональных ворсинок. Подобные манипуляции широко используются в клинике и почти полностью безопасны для зародыша и матери.

Доставку генетических конструкций в клетки плода можно осуществлять через эмбриональное кровообращение путем введения в пупочную вену. В настоящее время уже введена в клинику процедура забора крови эмбриона с помощью иглы под контролем ультразвука. Такие манипуляции могут быть осуществлены с шестой недели беременности, если необходимо получить гематопозитивские клетки или доставить генотерапевтический вектор к недоступным органам.

Большинство методов фетальной генотерапии разработаны на трансгенных мышах. Чужеродную ДНК вводили в оплодотворенные яйцеклетки, полученные от мышей с искусственно стимулированной овуляцией. Затем яйцеклетки имплантировали в матку приемной матери. С помощью этого метода удалось заметно улучшить состояние мышей с наследственным дефицитом соматотропного гормона миелина. В подобных экспериментах была получена важная информация о регуляции экспрессии генов и патогенезе наследственных болезней. Однако пока трансгенные животные получают только из 15-20% яйцеклеток с инъекционной ДНК, причем лишь у 20-30% животных введенный ген экспрессируется. Более того, из-за случайного встраивания чужеродной ДНК в клеточный геном, есть опасность повреждения генов хозяина (инсерционный мутагенез), приводящего к дефициту белка или нарушению регуляции, что может стать причиной злокачественного новообразования.

Таким образом, фетальная генотерапия пока недостаточно разработана для лечения наследственных болезней человека. В то же время методы, разработанные в экспериментах с эмбриональными клетками, могут быть использованы для пренатальной диагностики наследственных заболеваний на ранней стадии внутриутробного развития.

Соматическая генотерапия. При данном подходе генетический материал вводят только в соматические клетки, и он не передается половым клеткам. При соматической генной терапии генетические конструкции могут быть введены системно – *in vivo* (внутривенно, внутримышечно) и локально – *in situ* (сосуды, органы, опухоли), что наиболее предпочтительно и составляет основу терапевтических протоколов.

Если фетальная генотерапия пока неприемлема для лечения наследственных заболеваний человека, то соматическая генная терапия уже используется в клинической практике.

1.2. СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ (ДОСТАВКИ) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ В ОРГАНИЗМ

Существует три различных технологии (способа) введения терапевтической генетической конструкции больному при соматической генной терапии – *in vivo*, *in situ* и *ex vivo*.

Технология *in vivo* (системное введение через кровь) пока не реализована на практике. Это связано с затруднениями в разработке терапевтических протоколов, вызванными множеством потенциальных тканей-мишеней (кожа, мышцы, легкие, мозг, печень, клетки крови и т.д.). Многочисленность различных мишеней требует создания специфических и эффективных систем адресной доставки генетической конструкции.

***In situ* генная терапия.** Эта технология предполагает доставку генетических конструкций (чаще всего в составе вирусных векторов) локально, непосредственно в ткани организма. Для данного способа введения необходимы два условия: первое заключается в том, чтобы клетки-мишени были легкодоступны, и второе условие, – чтобы генетическая конструкция специфично проникала непосредственно в клетки-мишени и экспрессировала терапевтический ген длительное время и на высоком уровне.

Примерами генной терапии *in situ* служат:

- генная терапия муковисцидоза, основанная на локальном введении терапевтического гена в составе аденовирусного вектора в эпителий дыхательных путей;
- введение генноинженерных конструкций в массу опухоли в случае терапии злокачественных новообразований.

Ex vivo генная терапия. Представляет собой технологию, основанную на трансплантации (инфузии) собственных (аутологичных) клеток больного. При этом подходе из организма изолируют клетки, вводят в них требуемую генетическую информацию и затем

возвращают в тот же организм (рис. 1). Эти клетки иммунная система не отторгает.

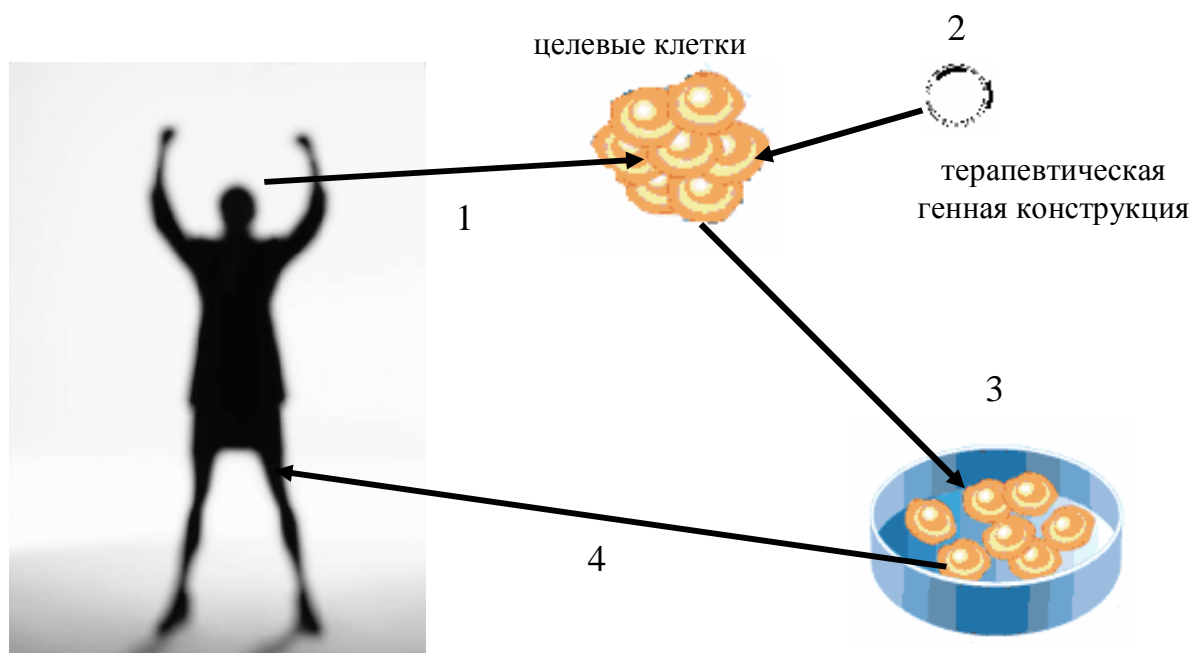


Рис. 1. Этапы генной терапии ex vivo.

- 1 – получение клеток от больного;
- 2 – исправление генетического дефекта с помощью терапевтической генной конструкции;
- 3 – отбор и наращивание «исправленных» клеток;
- 4 – инфузия или трансплантация этих клеток пациенту.

Преимуществом генной терапии ex vivo является то, что можно полностью охарактеризовать полученные трансформированные клетки до их трансплантации в организм, можно получить многочисленные клоны этих клеток и отобрать клоны с высоким уровнем экспрессии требуемого гена, а также исключить клоны с опасными трансформациями, которые могли бы нанести вред организму.

Использование технологии ex vivo просто решает проблему направленной доставки функционального гена в том случае, если из организма извлекают клетки определенного

типа (лимфоциты, стволовые гемопоэтические клетки, фибробласты, кератиноциты или гепатоциты), которые после трансфекции *in vitro* возвращаются в организм.

Для реализации стратегии *ex vivo* в качестве средств доставки генетической информации могут быть использованы аутогенные первичные клетки (бластоциты). Первые эксперименты были проведены с первичными астроцитами, которые были отобраны у взрослых доноров, трансфецированы и затем помещены в ткани центральной нервной системы, где эти клетки поддерживали длительную экспрессию введенного гена (рис. 2А).

Прекрасными суррогатными клетками являются фибробласты, которые обладают способностью долго пролиферировать в культуре, не трансформируясь, легкодоступны для отбора у доноров, полноценно поддерживают экспрессию встроенных генов. В последние годы проведены многочисленные эксперименты, направленные на применение фибробластов в генной терапии различных заболеваний (рис. 2Б).

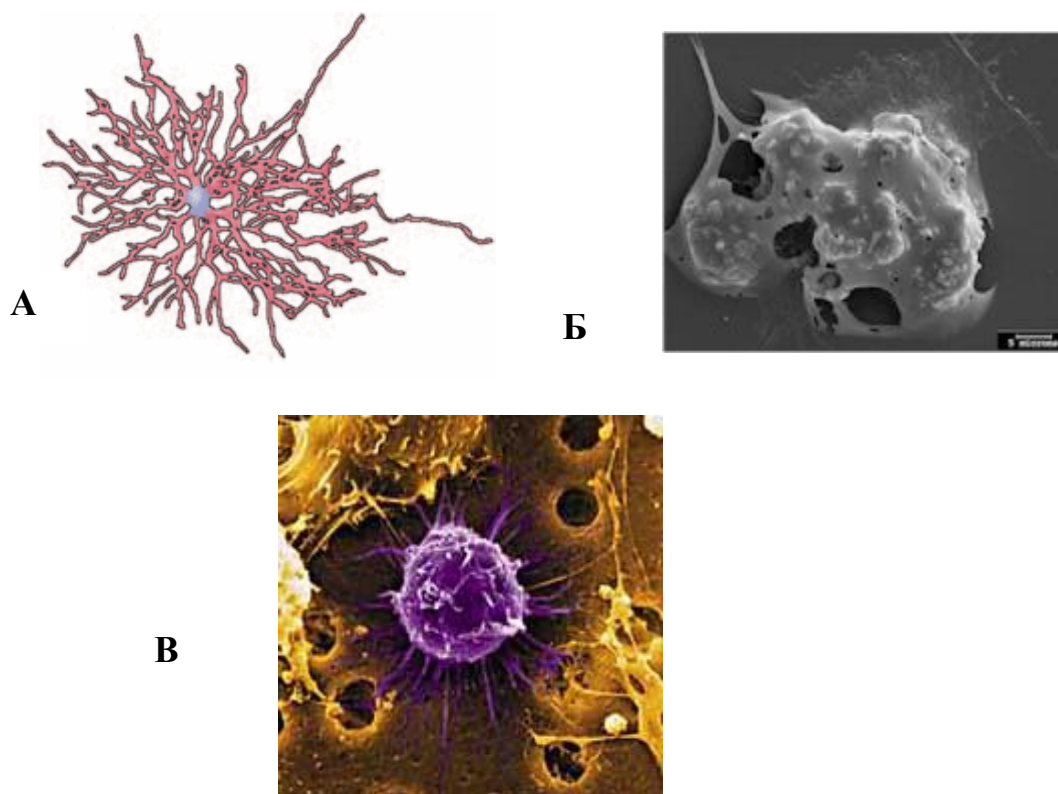


Рис. 2. Бластоциты, используемые в генной терапии

А – первичный астроцит ЦНС; Б – фибробласт; В – стволовая клетка красного костного мозга

Однако при использовании различных бластоцистов могут возникать сложности при их помещении после трансфекции в «неродные» ткани. Например, при трансплантации фибробластов в ткани центральной нервной системы они экспрессируют коллагены и другие свойственные коже вещества, которые нарушают правильное функционирование системы. Все эти проблемы могут быть преодолены при использовании стволовых клеток (рис. 2B). Основным преимуществом стволовых клеток является высокая совместимость с любыми тканями организма, что предполагает их длительное выживание и поддержание долговременной экспрессии введенных генетических конструкций.

Наиболее часто используются гематопоэтические стволовые клетки периферической крови. Они обладают широкой пластичностью, легкодоступны для сбора и последующего возвращения в кровь. Первичная предопределенность их к тем или иным органам (мозг, миокард) предполагает самостоятельный хоминг к необходимому органу.

Стволовые клетки костномозгового происхождения менее применимы для генотерапевтических манипуляций в связи с их труднодоступностью, сложностью культивирования и низкой эффективностью трансфекции с помощью вирусных векторов.

В процессе изучения находится методология использования фетальных стволовых клеток. Фетальные стволовые клетки достаточно хорошо культивируются, могут быть трансфецированы с применением классических методов. Проведены эксперименты по применению этих клеток для лечения болезни Паркинсона, нейродегенеративных заболеваний, диабета.

2. ПУТИ ДОСТИЖЕНИЯ ЛЕЧЕБНОГО ЭФФЕКТА ГЕННЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

2.1. ПОЗИТИВНАЯ ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Позитивная генная терапия направлена на восстановление функции гена, экспрессия которого может быть недостаточной или отсутствовать полностью. В большинстве случаев различные методы позитивной генной терапии направлены на коррекцию поврежденного гена.

2.1.1. Коррекция гена на уровне хромосомной ДНК

Восстановление функции гена путем его замены или дублирования. Такой подход может быть использован, например, при лечении рецессивных наследственных заболеваний, когда клетки теряют функцию какого-либо гена, и для лечения нужно эту функцию восстановить.

Идеальная стратегия предполагает «вырезание» больного гена или его части и замена его здоровым. Это можно было бы сделать с помощью таргетинга. *Таргетинг* (от англ. «target» – мишень) – встраивание генотерапевтической конструкции в определенное место генома, что позволяет обеспечить гену истинно природный путь регуляции. Для достижения эффективной гомологичной рекомбинации в состав вводимых конструкций включают селективные маркеры, которые обеспечивают встраивание в геном клетки трансгенов, наиболее предрасположенных к рекомбинации. Однако таргетинг различных генов с дополнительными последовательностями осложняется непредсказуемыми последствиями, которые могут быть причиной злокачественной трансформации клеток человека.

В настоящее время используют другой, близкий к таргетингу способ коррекции, который предполагает введение здоровых генов при условии сохранения в клетке больного гена. Дополнительный здоровый ген увеличивает количество недостающего клетке или организму продукта. Этот способ называют *пополняющей (augmentative) генной терапией*. Однако, при такой терапии может происходить инсерционный мутагенез и правильная регуляция экспрессии трансгена нарушается. Трансген с нарушенной регуляцией называют эктопическим.

Репарационная коррекция генетических дефектов с использованием химерных олигонуклеотидов. Такая генотерапевтическая коррекция имеет несколько значительных преимуществ перед другими подходами генной терапии. Во-первых, при репарации того или иного дефекта ген остается под контролем нативных регуляторных элементов. Во-вторых, коррекция может быть направлена на восстановление как рецессивных, так и доминантных мутаций. В-третьих, репарация подразумевает использование небольших синтетических молекул, которые слабо иммуногенны. В-четвертых, применение небольших молекул облегчает их проникновение в клетку, а затем и в ядро. И, наконец, эффективно разработанная генная коррекция может быть успешно применена в течение одного курса лечения.

Химеропластика – использование химерных одно- или двунитовых РНК/ДНК олигонуклеотидов (химеропластов), способных образовывать гомологичные пары и осуществлять сайт-специфическую гомологичную рекомбинацию с ДНК-дуплексом. Первая химера представляла собой 68-членный ДНК-РНК двуцепочечный олигонуклеотид (рис. 3). Одна цепь данного химеропласта состояла из центрального пентамерного блока ДНК-остатков, фланкированных по краям десятью 2'-О-метилованными РНК-остатками (О-метилирование предотвращает расщепление РНК-последовательности РНКазой).

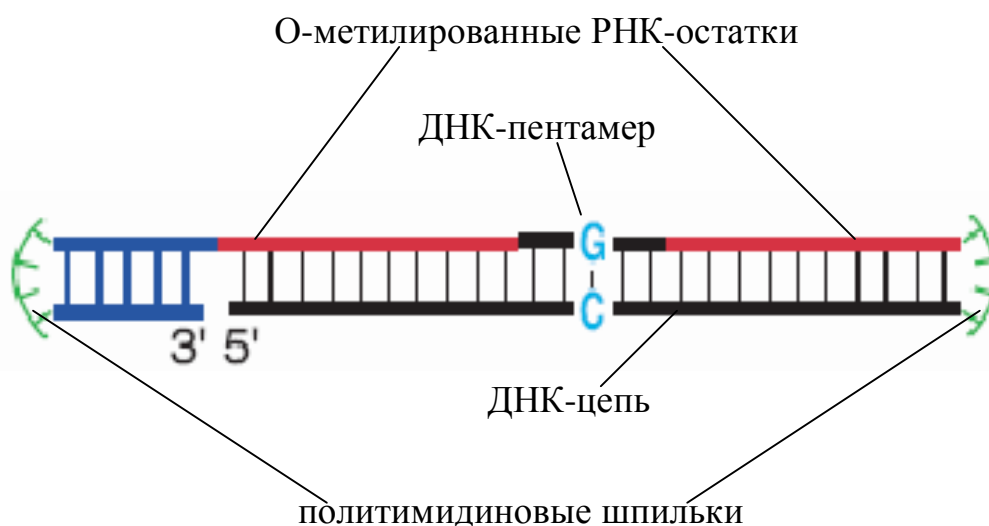


Рис. 3. Химеропласт

Вторая цепочка была представлена комплементарной цепью ДНК. Вторичную структуру химере обеспечило наличие по краям политимициновых шпилек. Концы молекул объединены за счет GC-оснований, способствующих повышению экзонуклеазной

устойчивости. 3'- и 5'-концы полученной химеры лишь приближены, но не замкнуты для последующего завершения работы этой химеры на месте и для возможного присоединения белков-рекомбиназ. Незамкнутость позволяет молекуле быть достаточно гибкой, что повышает ее способность взаимодействовать с гомологичной цепью. Обе цепочки – и верхняя, и нижняя – гомологичны геномной цели, за исключением пентамерной ДНК-области в химерной цепи.

Введение в клетку химеропластов осуществляют с помощью липосом. При попадании в клетку химера очень точно образует гомологичные пары с нуклеотидами гена-мишени, за исключением мисмэтча (от англ. mismatch – несоответствие) – области несоответствия двух нуклеотидных оснований, которые и нужно заменить. Образование этих мисмэтчей приводит к запуску специализированной клеточной ДНК-репарирующей системы (рис. 4).

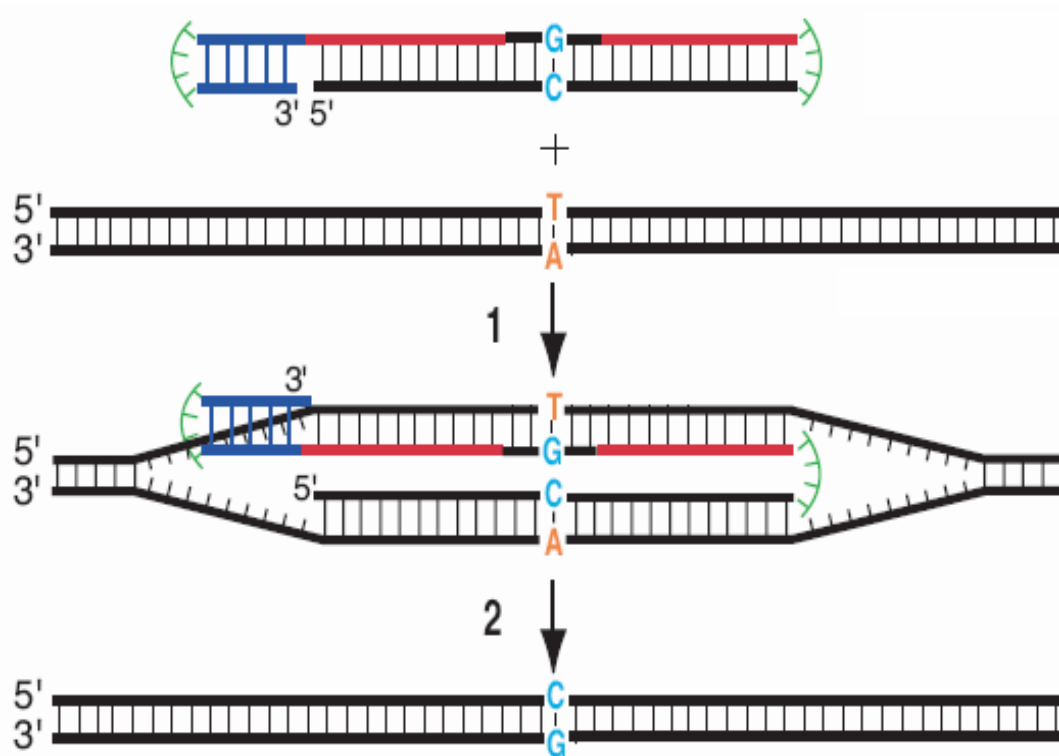


Рис. 4. Коррекция генетического дефекта с использованием химеропласта в процессе сайт-специфической гомологичной рекомбинации

Испытание технологии химеропластики было проведено на различных объектах – лимфобластах, растительных клетках, дрожжах. Показательными опытами явились опыты

с меланоцитами мышей-альбиносов – использование химеропластов привело к восстановлению гена тирозиназы – основного фермента синтеза меланина.

Создан химеропласт, направленный на коррекцию гена фактора свертывания крови IX у крыс, дефектных по этому фактору. Целевую доставку химеропласта в печень обеспечивали в составе транспортных везикул, слитых с асиалогликопротеином, рецептор для которого имеется только на гепатоцитах. В результате, у 15-40% крыс в крови был обнаружен фактор IX. Восстановленные гены сохраняли свою способность кодировать нормальный продукт на протяжении двух лет.

Применение химеропластов дало положительные результаты при коррекции гена, кодирующего мутантную изоформу аполипопротеина E, приводящего к развитию гиперлипидемии и раннему атеросклерозу. Опыты на клеточной культуре привели к коррекции генов в 54% клеток. В опытах на лабораторных животных эффект проявился в 25% случаев.

Технология химеропластики также была применена при одной из форм β -талассемии, обусловленной точечной мутацией во втором интроне β -глобинового гена. Эта мутация приводит к тому, что интрон распознается как аутентичный сайт сплайсинга. В результате этого часть интрона включается в процессированную мРНК, сдвигается рамка считывания и образуется укороченный белок. Антисмысловой химеропласт, комплементарный мутантному интрону, гибридизуясь с ним, блокирует ошибочный сплайсинг. В результате введения такого антисмыслового олигонуклеотида в культуру человеческих малигнизированных стволовых клеток-предшественников эритроцитов число нормальных β -глобиновых цепей увеличилось на 50%.

Основными проблемами, возникающими при проведении химеропластики, являются:

- выявление и молекулярно-генетическая характеристика определенного дефекта;
- конструирование специфичного химеропласта;
- создание условий для взаимодействия химеропласта с рекомбиназными белками;
- включение системы репарации.

Для коррекции генетических дефектов могут быть использованы *одноцепочечные олигонуклеотиды*, работа которых не требует участия рекомбиназ. Одноцепочечные молекулы ДНК или РНК могут формировать стабильные и специфичные третичные структуры с ДНК за счет образования водородных связей с гомопуриновыми областями в

геноме (рис. 5). Такие одноцепочечные олигонуклеотиды получили название **триплекс-формирующих олигонуклеотидов (ТФО)**.

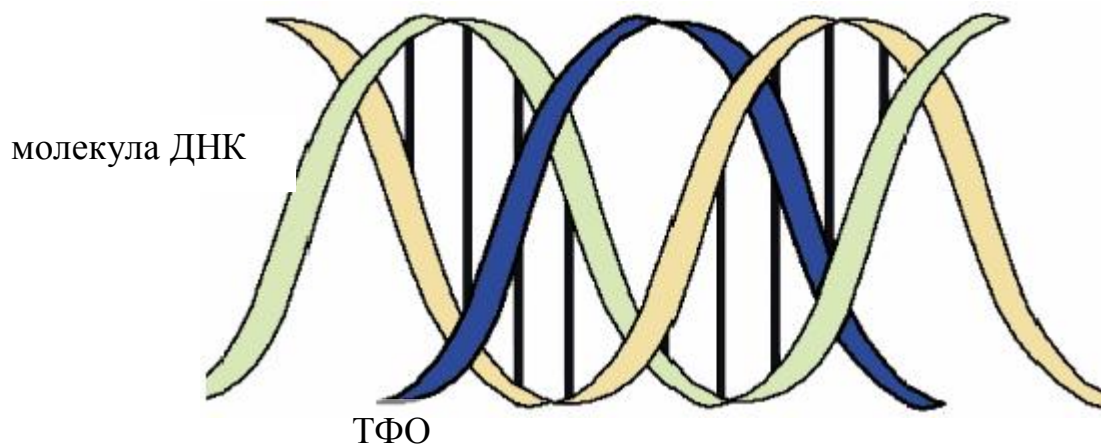


Рис. 5. Формирование третичной структуры ДНК с участием ТФО

Сначала ТФО использовали в качестве блокаторов, так как была показана их способность ингибировать транскрипцию за счет перекрывания сайтов связывания транскрипционных факторов. Первые успехи в этом направлении были достигнуты исследователями в ингибировании транскрипции онкогена *c-myc*. Однако дальнейшие работы с генами, кодирующими различные полимеразы, в том числе РНК-полимеразу II и РНК-полимеразу III, продемонстрировали возможность использования ТФО для блокады непосредственно кодирующих регионов.

На примере γ -глобулинового гена мыши было продемонстрировано использование ТФО для усиления генной транскрипции. Эффект достигался за счет связывания ТФО с репрессорными белками, которые, в конечном итоге не могли препятствовать транскрипции. В условиях *in vitro*, в результате сшивки ТФО с трансактиваторными белковыми доменами, также участвующими в регуляции транскрипции, были получены так называемые пептидные нуклеиновые кислоты PNA (от англ. «peptide nucleic acids»). Эти структуры, взаимодействуя с ДНК, приводят к формированию ДНК-петлей. Если нуклеотидная последовательность ДНК-петли является кодирующим регионом какого-либо гена и представляет собой «транскрипционный пузырь», то экспрессия такого гена усиливается в несколько раз. Примечательно, что наблюдалось усиление экспрессии не только гена, локализованного в пределах ДНК-петли, но и соседних генов.

Позднее появились исследования, в которых ТФО соединяли с различными мутагенами, соединение приводило к сайт-специфичным повреждениям в геноме (рис. 6), что, в свою очередь, способствовало активации репарирующих систем. Одним из мутагенов, используемых для сшивки с ТФО, является псорален. Псорален-связанные ТФО встраиваются в двухцепочечную ДНК-молекулу и активируются под воздействием ультрафиолетового излучения. Образовавшиеся повреждения приводят к запуску механизмов эксцизионной репарации.

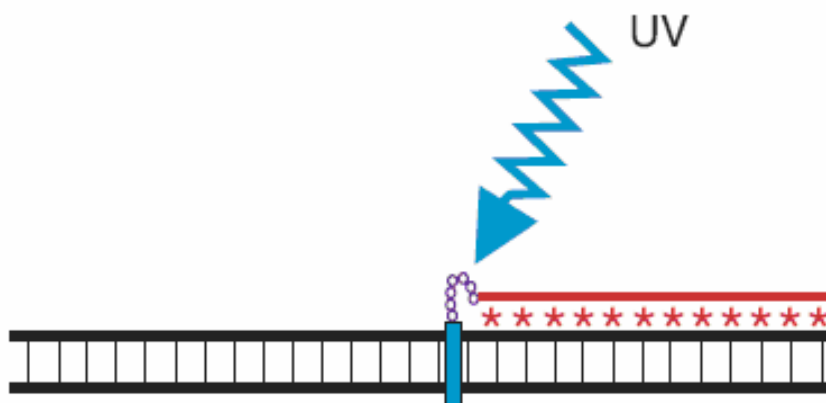


Рис. 6. Триплекс-формирующие олигонуклеотиды, шитые с псораленом

Однако сами ТФО, связанные с ДНК-молекулой без каких-либо мутагенов, также рассматриваются клетками как инородные структуры, что приводит к гомологичной рекомбинации и включению эксцизионной репарации.

Данные о том, что образующиеся с помощью ТФО трехцепочечные участки ДНК провоцируют ДНК-репарирование в этих фрагментах, привели к развитию технологий позитивной генной терапии с участием ТФО. ТФО связывали с небольшим ДНК-фрагментом, направленным на замену поврежденной гомологичной области. Последовательность ТФО была комплементарна области, соседней с поврежденным участком. Триплексная часть этих молекул активировала системы репарации, а за счет ДНК-фрагмента шла гомологичная рекомбинация с дефектным участком ДНК (рис. 7).

В настоящее время активно разрабатываются способы доставки ТФО-конструкций к месту генетического повреждения на уровне клетки и доставки на уровне организма. Наиболее успешными методами доставки оказались электропорация, микроинъекции и катион-липидная технология. Интраперитонеальные инъекции ТФО в организм мыши с генными дефектами также приводили к положительным результатам.

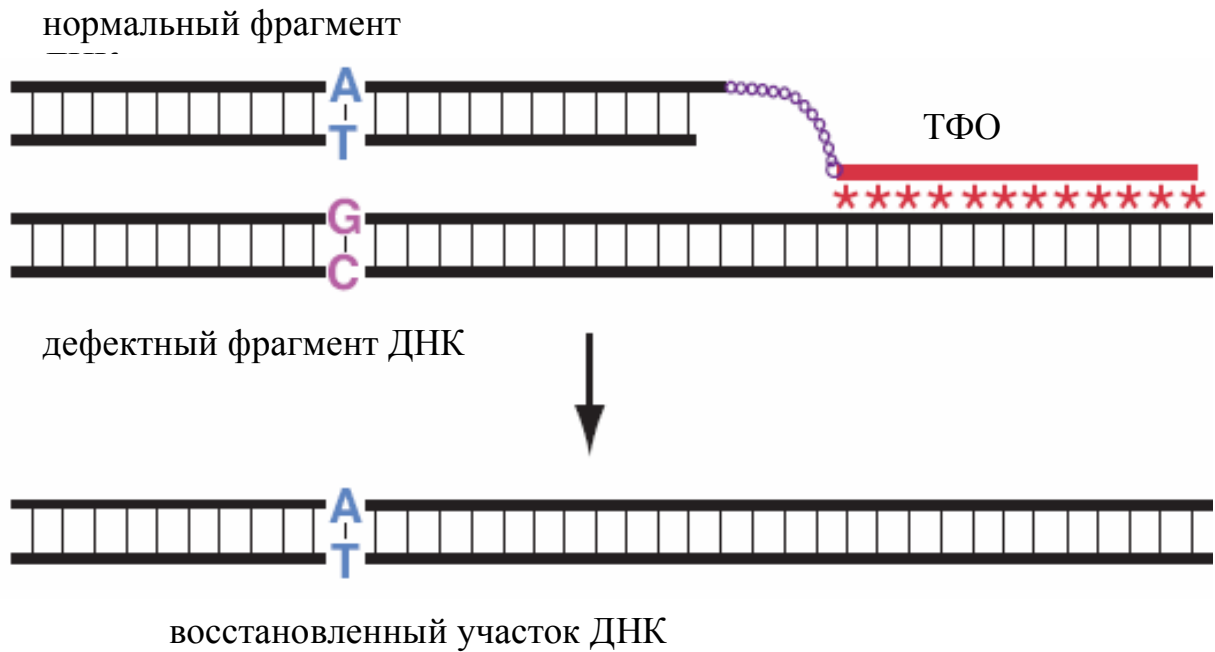


Рис. 7. ТФО-индуцированная рекомбинация

Другой вид генной коррекции основан на *гомологичной рекомбинации небольших фрагментов* – *SFHR* (от англ. small fragment homologous replacement). Для этой цели используют одноцепочечные или двуцепочечные ДНК-фрагменты длиной несколько сотен нуклеотидов, соответствующие только некодирующим регионам (рис. 8).

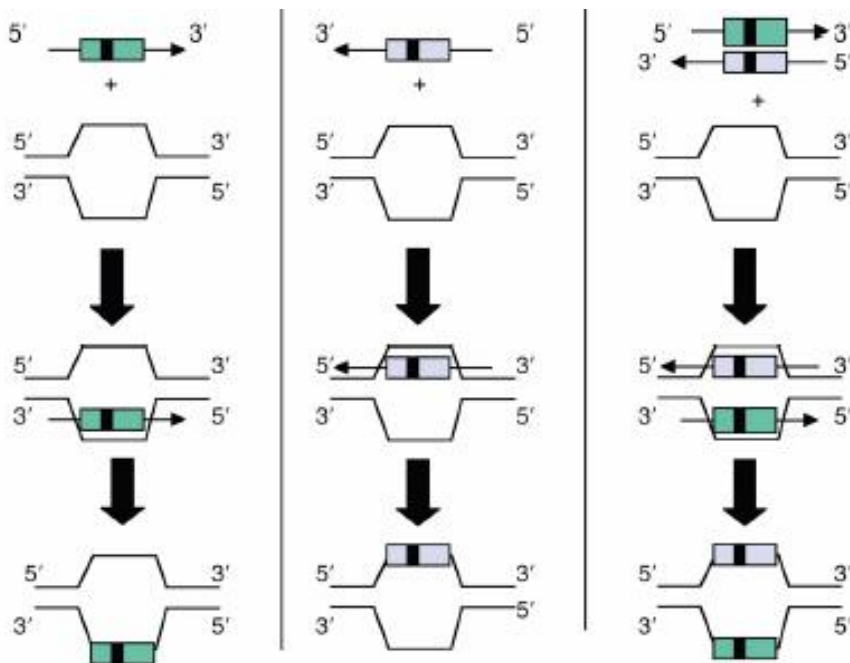


Рис. 8. Варианты гомологичной рекомбинации с участием одноцепочечных и двуцепочечных ДНК-фрагментов

ДНК-фрагменты получают с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако механизм SFHR до сих пор точно не установлен. Предполагается участие рекомбиназ в создании промежуточных структур и последующего обмена генетическим материалом.

Этот вид коррекции испытывается на лабораторных животных и культурах клеток, содержащих различные мутации (мутация гена, регулирующего трансмембранную проводимость при муковисцидозе; мутации, связанные с развитием мышечной дистрофии Дюшенна; мутации β -глобинового гена при серповидно-клеточной анемии). Экспериментальные исследования по использованию SFHR коррекции генных повреждений на культурах клеток различного происхождения показали положительные результаты в 15-20% случаев, а на животных моделях – лишь в 4% случаев.

2.1.2. Внехромосомная экспрессия введенного гена

Методические сложности, связанные с коррекцией дефектов гена на уровне хромосомной ДНК и непредсказуемость вмешательства в генетическую информацию клеток, тормозят развитие данного направления позитивной генной терапии. В связи с этим значительное развитие получили методы введения в клетки организма нормальных функционально активных генов, которые могут быть встроены в специфические места хромосомы или экспрессироваться внехромосомно.

В настоящее время наибольшее применение получила методология использования в качестве лечебного препарата генетических конструкций, способных к автономной репликации и экспрессии встроенных генов. При этом в генетическую конструкцию могут быть введены, как функционально активные гены – аналоги дефектных генов (терапевтические гены), так и последовательности ДНК, регулирующие активность гена с недостаточной экспрессией. Таким образом, в отличие от методологии, направленной на коррекцию ДНК, данный подход не предполагает вмешательства в структуру хромосомной ДНК.

Разработке внехромосомной генной терапии способствовало получение знаний:

- о первичной структуре генов, ответственных за наследственные, онкологические и другие заболевания;
- о функции и роли в метаболизме продуктов этих генов;
- о положении гена в хромосоме и его окружении (наличие регуляторных элементов).

Для успешной реализации данного направления положительной генной терапии должны быть решены две глобальные задачи. Во-первых, должна быть создана терапевтическая генетическая конструкция. При создании такой конструкции используют технологию рекомбинантных ДНК, которая включает несколько этапов:

1. Выделение терапевтического гена в контексте регуляторных последовательностей. В настоящее время этот этап значительно упростился в связи с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).
2. Выбор или создание векторной ДНК, удовлетворяющей поставленной цели.
3. Выделение или искусственный синтез регуляторных элементов.
4. Лигирование фрагментов ДНК (ДНК вектора, гена, регуляторных элементов, маркерных участков) в нужной последовательности и ориентации.
5. Клонирование конструкции в оптимальных клетках и отбор рекомбинантных клонов.
6. Проверка эффективности экспрессии гена и свойств его продукта.

Вторая глобальная задача, которая должна быть решена для успешного результата внехромосомной генной терапии – осуществление адресной доставки генетической конструкции в целевые клетки-мишени, то есть трансфекции (в широком смысле) или трансдукции (при использовании вирусных векторов).

Трансфекция может проводиться с использованием:

- чистой («голой» – от англ. naked) ДНК;
- встроенной в соответствующую плазмиду, или комплексированной ДНК (плазмидная ДНК, соединенная с солями, белками (трансферрин), органическими полимерами);
- ДНК в составе вирусных частиц, предварительно лишенных способности к репликации.

Основные методы доставки терапевтических генов в клетки разделяют на биологические (на основе векторных систем), химические и физические (безвекторный перенос).

2.1.2.1. Векторный перенос генов

При испытаниях соматической генотерапии чаще всего используют вирусные векторы. Только вирусные векторы или генетические конструкции, включающие вирусные

последовательности, способны к активной трансдукции, а в некоторых случаях и к длительной экспрессии чужеродных генов. Из более 175 одобренных протоколов клинических испытаний по генотерапии более 120 предполагают использовать вирусную доставку и около 100 из них основаны на применении ретровирусных векторов.

Ретровирусный вектор. Ретровирусы (сем. Retroviridae) – это инфекционные агенты, чей геном внедряется в геном клетки, что может привести к ее злокачественной трансформации. Такую вероятность необходимо уменьшить или полностью исключить.

Геном ретровируса представлен двумя молекулами РНК позитивной полярности размером $\approx 7,5$ т.н.о., структурно организованными в виде мРНК. В процессе жизненного цикла вируса внутри клетки РНК проходит стадию обратной транскрипции, после чего комплементарная ДНК (кДНК) интегрирует в геном клетки-хозяина и сохраняется там в виде провируса (рис. 9). После транскрипции полноразмерная мРНК ассоциирует с вирусоспецифическими белками и упаковывается в капсид.

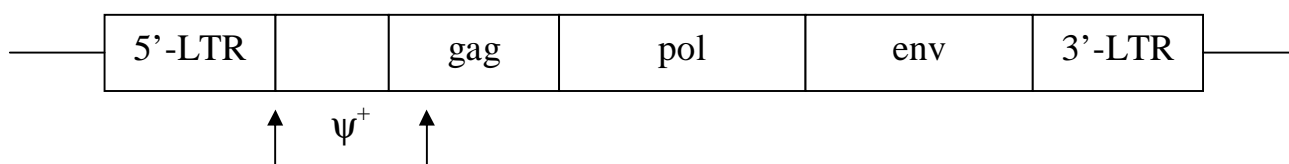


Рис. 9. Структурная организация провируса ретровируса

5'-LTR – длинный концевой повтор, несущий сигнал регуляции транскрипции;

3'-LTR – последовательность, несущая сигнал полиаденилирования;

ψ^+ – последовательность пси⁺, необходимая для упаковки вирусной РНК;

gag – ген, кодирующий структурный белок внутреннего капсида;

pol – ген, кодирующий обратную транскриптазу (ревертазу);

env – ген, кодирующий белок оболочки.

Для получения ретровирусного вектора, например на основе мышинового ретровируса MuMLV, полноразмерную кДНК встраивают в плазмиду, затем с помощью эндонуклеазного расщепления удаляют большую часть гена *gag* и гены *pol* и *env*, оставляя 5'-концевой участок гена *gag* и 5'- и 3'-LTR. Далее, рядом с ψ^+ -областью встраивают «терапевтический» ген, транскрипция которого будет контролироваться 5'-LTR-промотором (рис. 10).

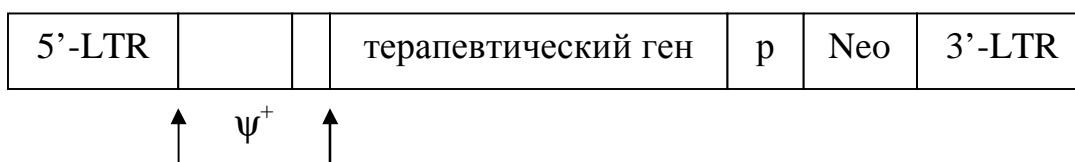


Рис. 10. Модификация ДНК ретровируса для создания вектора

ψ^+ – упаковочный сигнал;

Neo – селективный маркер;

P – вирусный промотор для транскрипции Neo.

Недостатком таких ретровирусных векторов является ограничение размера ДНК, которую можно переносить с их помощью. Только фрагменты, не превышающие примерно 8 т.п.н., могут транспортироваться в геномы таким путем.

ДНК ретровирусных векторов, содержащая терапевтический ген, может быть использована для трансформации клеток сама по себе, но эффективность ее доставки в ядро и интеграции в геном клетки-хозяина крайне низка. В связи с этим разработана методика упаковки полноразмерной транскрибированной РНК ретровирусного вектора в интактные вирусные частицы, с высокой частотой проникающие в клетку, что гарантирует встраивание соответствующей ей ДНК в геном клетки-мишени. Группа ученых во главе с Р. Манном (1983 г.) сконструировали первую, так называемую, «паковую» клеточную линию для упаковки ретровирусного вектора. Геном ретровируса с предварительно удаленной нуклеотидной последовательностью ψ^+ , ответственной за упаковку, был встроен в хромосому клеточной линии, которая в этих условиях производила пустые вирусные капсиды. После трансфекции этих клеток ДНК-конструкцией, которая содержала необходимую для упаковки ψ^+ -последовательность, терапевтический ген и LTR, но не содержала ретровирусные гены, ее полноразмерный РНК транскрипт упаковывался в вирусные частицы (рис. 11). Затем химерные вирусы использовали для доставки «терапевтического» гена в нужные клетки.

Такие «паковые», хелперные клеточные линии называли **одногеномные хелперные линии**, так как вспомогательные вирусные конструкции, которые они несут, представлены в виде полной вирусной последовательности, встроенной в геном клетки-хозяина. Этот подход был принят на вооружение другими исследователями, занимающимися генной терапией. Спустя несколько лет исходную «паковую» клеточную линию адаптировали и для других вирусных векторов.

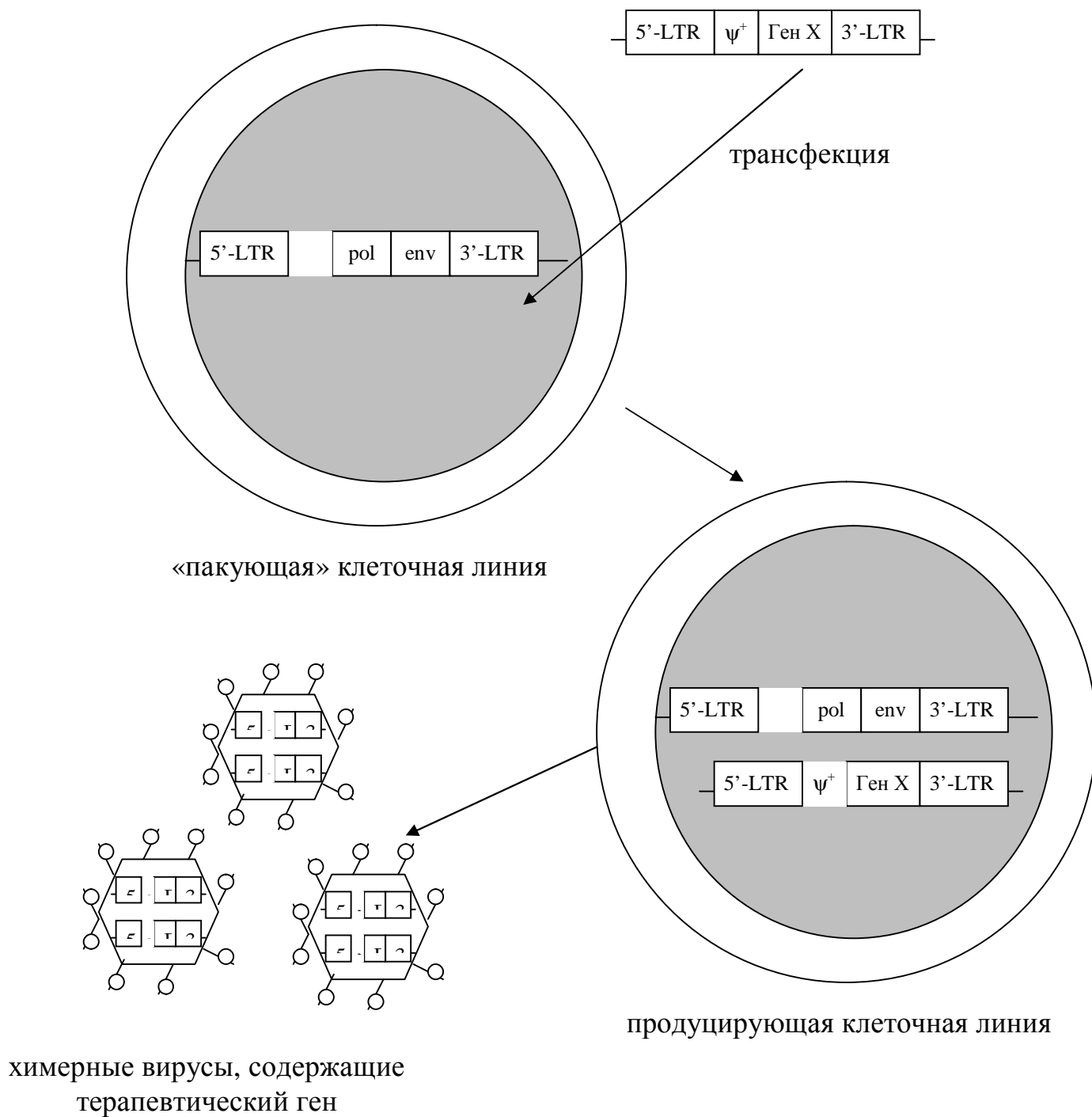


Рис. 11. «Пакующая» клеточная линия для упаковки ретровирусного вектора

При создании первых ретровирусных векторов существовало несколько трудностей и опасностей в их использовании для целей генной терапии:

1. Количество псевдовирусных частиц, получаемых из «пакующей» клеточной линии мало, примерно 10^6 в миллилитре культуральной среды. Этого более или менее достаточно для генной терапии *ex vivo*, но совершенно не приемлемо для терапии *in vivo*.

2. Проникновение ретровирусной частицы в клетку зависит от наличия на ее поверхности специфического для данного ретровируса рецептора. Поэтому не все клетки могут быть трансфицированы.

3. Уровень экспрессии ретровирусного трансгена, интегрированного в геном клетки-мишени случайным образом, зависит от эффекта положения. В клеточной популяции, трансфицированной ретровирусным вектором, разные клетки сильно отличаются друг от друга по уровню экспрессии трансгена, поскольку он оказывается в них в разных положениях. В некоторых случаях ретровирусные последовательности теряются из генома или перегруппировываются.

4. Интеграция ретровируса в геном некоторых клеток может инактивировать ген-онкосупрессор.

5. Возможна рекомбинация между дефектным ретровирусом, который сам по себе не опасен, и каким либо из эндогенных ретровирусных элементов, присутствующих в «пакующей» линии клеток. Геном млекопитающих буквально начинен такими элементами, которые являются остатками былых ретровирусных инфекций наших предков. В результате рекомбинации может возникнуть компетентный инфекционный ретровирус.

В связи с этим все трансдуцированные клетки-мишени, полученные в результате их совместного культивирования с клетками «пакующей» линии, необходимо тестировать по нескольким позициям:

- синтезируется ли в них продукт терапевтического гена;
- не образуются ли компетентные по репликации ретровирусы;
- не встроилась ли ДНК ретровирусного вектора в сайт, изменяющий способность клеток к росту, либо препятствующий их нормальному функционированию.

Современные варианты ретровирусных векторов характеризуются высокой эффективностью трансдукции, широким спектром клеток-хозяев, эффективной экспрессией встроенных генов.

Аденовирусные векторы. Аденовирусы (сем. Adenoviridae, род Mastadenovirus) – широко распространенные ДНК-содержащие вирусы, вызывающие заболевания, характеризующиеся полиморфизмом клинических проявлений. Эти вирусы могут поражать слизистые верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, конъюнктивы, мышечные клетки, клетки головного мозга.

В связи с этим векторы на основе аденовирусных вирусов обладают широкой видовой и тканевой специфичностью, эффективно переносят гены как в делящиеся, так и в неделящиеся клетки, обеспечивают высокие титры рекомбинантного вируса, высокий уровень экспрессии вводимых генов, не интегрируют в геном клеток-хозяев, оставаясь внехромосомными. Это уменьшает опасность инсерционного мутагенеза и индукции злокачественного роста, характерного для ретровирусов. Описанные свойства делают аденовирусы перспективными для доставки генов в клетки-мишени.

Кроме того, аденовирусные векторы могут быть использованы для эффективной доставки генов в клетки эпителия верхних дыхательных путей *in vivo*. Этот эпителий является природным местом инфекции для большинства аденовирусов, поэтому в данном случае аденовирусы имеют преимущество перед ретровирусами, поскольку последние, хотя и могут реплицироваться в эпителии, не могут быть получены в достаточно высокой концентрации для целей терапии *in vivo*.

Для целей генной терапии используют геномы аденовирусов группы С серотипов 2 и 5, не обладающих онкогенным потенциалом. Геном аденовирусов представляет собой линейную двунитевую ДНК размером до 36 т.п.о. (рис. 12). Такой геном позволяет производить устойчивые интегранты, включающие последовательности до 7,5 т.п.о.

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

Рис. 12. Структурная организация генома аденовируса

E1 – область, критическая для трансформации; E1A – регулятор транскрипции; E1B – кодирует трансформирующий антиген, связывающий клеточный белок p53; E2B – кодирует ДНК-полимеразу; E2A – кодирует ДНК-связывающий белок; E3 – кодирует продукты, необходимые для репликации и взаимодействующие с молекулами HLA I класса; E4 – кодирует продукты, взаимодействующие с ядерным матриксом; ITR – инвертированные концевые повторы ≈100 п.н.

Для получения аденовирусного вектора создана пакующая клеточная линия с интегрированным функциональным геном E1 аденовируса, кодирующим продукты,

необходимые для формирования вирусных частиц. В отсутствие гена E1 вирусные продукты не упаковываются в частицы (рис. 13).

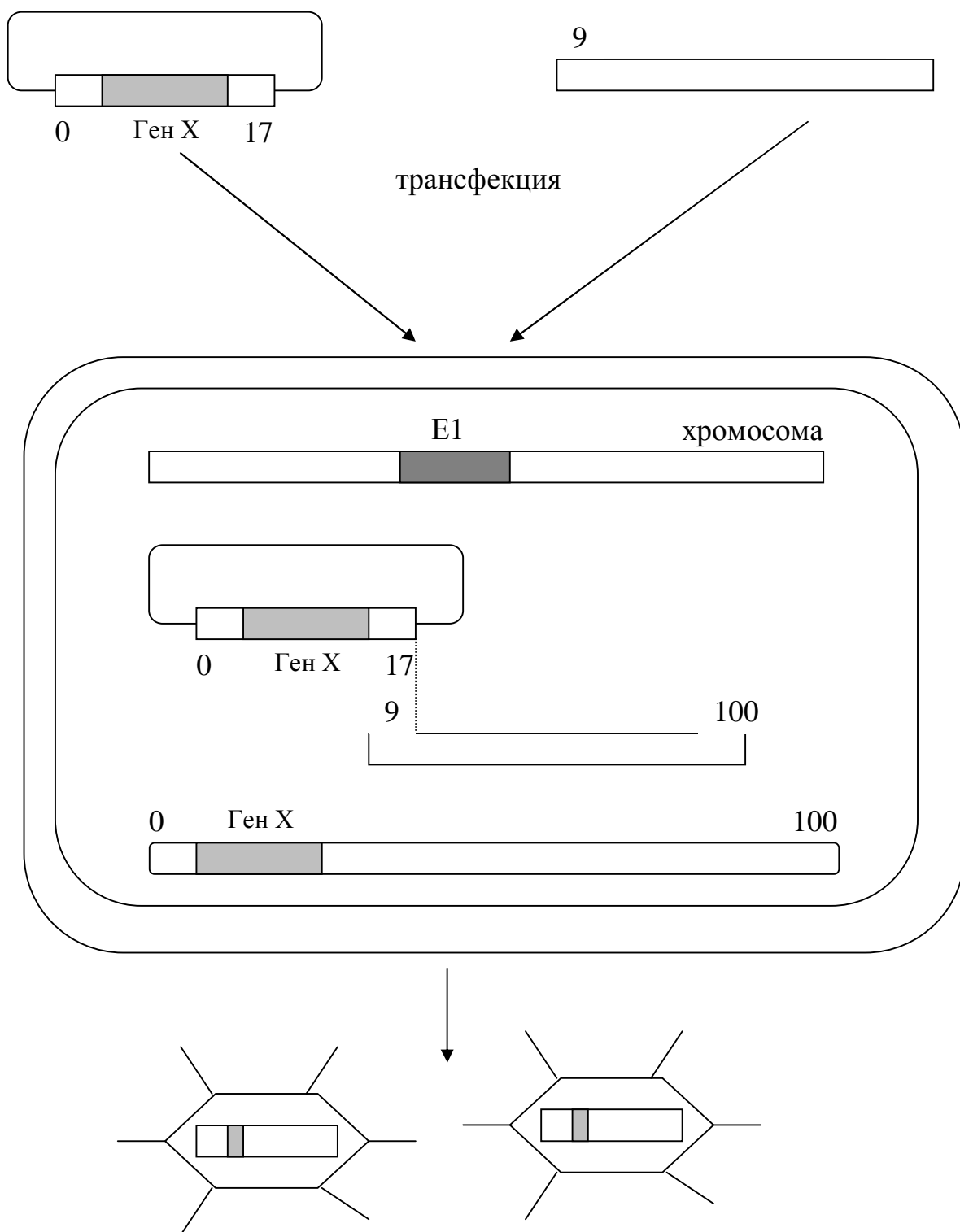


Рис. 13. Получение аденовирусного вектора первого поколения

Ген X – терапевтический ген

Была проведена котрансфекция таких клеток двумя фрагментами ДНК генома аденовируса, общая длина которых составляла 100 единиц (локусов) картирования. Один из фрагментов (0-17 локусы), в котором E1-область заменена терапевтическим геном, был встроен в челночный вектор на основе плазмиды *E. coli* и фланкирован нуклеотидными последовательностями аденовируса. Второй фрагмент представлял собой усеченную молекулу ДНК аденовируса (9-100 локусы), лишенную первых восьми локусов, включающих E1-ген. Этот фрагмент имеет перекрывающийся участок с плазмидой, несущей терапевтический ген.

После введения этих фрагментов ДНК в клетки-мишени в результате их рекомбинации происходит восстановление полноразмерной аденовирусной ДНК, в которой вместо E1-области находится терапевтический ген. Далее химерный геном упаковывается в оболочку аденовируса и рекомбинантный аденовирус используется для инфицирования клетки-мишени. ДНК вируса проникает в ядро, где происходит экспрессия терапевтического гена.

Однако, такая эпихромосомная локализация терапевтического гена имеет и недостатки, связанные с непродолжительностью экспрессии трансгена (недели, в лучшем случае месяцы). В результате аденовирусные векторы приходится вводить пациентам не единожды, а регулярно. Такие многократные введения рекомбинантного аденовируса могут приводить к развитию у пациентов (например, у больных муковисцидозом) выраженного иммунного ответа и гибели трансдуцированных клеток.

Векторы на основе аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированный вирус (ААВ) (сем. Parvoviridae) - это небольшой, непатогенный для человека вирус, геном которого представляет одноцепочечную ДНК размером 4,68 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н). Для продуктивной инфекции ААВ необходимы белки вирусов-помощников, например аденовирусов. При инфекции клеток ААВ попадает в ядро, его геном с помощью полимераз клетки-хозяина преобразуется в двухцепочечную ДНК и интегрирует с геномом клетки-мишени.

Отсутствие патогенности делает ААВ перспективным вектором для доставки в организм терапевтических генов. Рекомбинантный ААВ получают с помощью котрансфекции клетки-хозяина, инфицированной вирусом-помощником (аденовирусом или вирусом герпеса), двумя плазмидами. Одна из них несет терапевтический ген, фланкированный инвертированными концевыми повторами длиной 125 т.п.н. ААВ, а вторая – два его гена, *rep* и *cap*, ответственных за репликацию генома и синтез белка

капсида. После лизиса инфицированных клеток рекомбинантные ААВ отделяют от вирусов-помощников с помощью центрифугирования и диализа. Эти векторы могут нести ДНК-вставку размером до 4,5 т.п.н, не вызывают развитие иммунного ответа, т.к. не содержат генов ААВ.

ААВ используют для трансдукции миоцитов, гепатоцитов и нейронов.

Вектор на основе вируса простого герпеса (HSV). Вирус простого герпеса относится к сем. Herpesviridae, п/сем Alphaherpesvirinae, р. Simplexvirus. В отличие от ретровирусов и аденовирусов, не обладающих сродством к определенному типу клеток, вирус простого герпеса типа 1 (HSV-1) инфицирует только нейроны. В связи с этим векторы на основе HSV-1 являются наиболее подходящими для генной терапии заболеваний нервной системы (опухоли, нейродегенеративные заболевания, такие, например, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и др.).

Геном HSV-1 представлен двухцепочечной ДНК размером 152 т.п.н. Такой большой размер генома затрудняет генетические манипуляции с ним. Для решения этой проблемы сконструирован челночный вектор, включающий последовательности плазмиды кишечной палочки и «усеченный» геном HSV, состоящий из нуклеотидных последовательностей, ответственных за начало репликации и упаковку вирусных частиц. Такие рекомбинантные плазмиды, получившие название ампликон-плазмиды, способны переносить до 8 т.п.н. чужеродной ДНК.

В большинстве систем доставки генов на основе HSV-вектора используют модифицированные вирусы-помощники, которые поставляют белки, необходимые для репликации и сборки вируса, но не образуют собственных инфекционных вирусных частиц. В результате котрансфекции клетки-хозяина вирусом-помощником и ампликон-плазмидой образуется HSV-вектор, несущий 10 тандемных копий терапевтического гена в составе ампликон-плазмиды, упакованной в капсид, предоставленный вирусом-помощником.

Доклинические испытания на животных показали, что гены, доставленные с помощью HSV-векторов в клетки мозга и периферической нервной системы, экспрессируются и поддерживаются длительное время.

Фенотипическое смешивание. Это способ, при котором вектор сконструированный на основе генома одного вируса, упаковывают в капсид другого вируса. Данный метод применяют для увеличения числа образующихся вирусных частиц, повышения

эффективности и специфичности трансдукции, что особенно актуально при трансдукции неделящихся клеток. При реализации принципов фенотипического смешивания можно как сузить спектр инфицируемых вирусом клеток до строго определенного типа, так и расширить его.

Например, в ген *env* ретровируса можно встроить нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид, специфичный для связывания с определенным клеточным рецептором, что обеспечит внедрение рекомбинантного ретровируса в нужные клетки-мишени. Так удалось получить химерные белки оболочки ретровируса, содержащие последовательности аминокислот, изменяющие тропизм вируса. В частности, слияние эпидермального фактора роста с белком оболочки амфотропного ретровируса привело к взаимодействию вирусов преимущественно с ближайшими клетками, содержащими на своей поверхности рецепторы фактора. После отщепления эпидермального фактора роста протеиназой вирусные частицы начинали заражать клетки, экспрессирующие гомологичные вирусные рецепторы.

Для эффективного изменения тропизма ретровирусов может быть использовано химическое присоединение лактозы или десиалирование гликопротеинов оболочки вируса. Оба типа модификации дают возможность вирусным частицам специфически взаимодействовать с определенными рецепторами, присутствующими, например, на поверхности гепатоцитов. Модифицированные таким способом экотропные вирусы приобретают способность с высокой эффективностью заражать гепатоциты человека. Фенотипически смешанные вирусы, способные проникать только в определенный тип клеток, имеют перспективу использования при генной терапии *in vivo*.

Векторы невирусной природы. Для создания невирусных систем доставки могут быть использованы последовательности мобильных элементов – ***транспозонов***. Впервые для этих целей был использован транспозон SB (Sleeping Beauty), выделенный из генома лососевых рыб. Этот транспозон не требует наличия в клетках хозяина каких-либо факторов транспозиции, что позволяет внедрять его в клетки различных организмов, включая человека (рис. 14).

Sleeping Beauty относится к мобильным элементам II типа, которые переносятся как ДНК-элементы с помощью ферментов транспозаз. Мобильные элементы II типа имеют на концах инвертированные повторы (IR), в каждом из которых имеется по одному сайту для связывания с транспозазами. У транспозона SB сайты связывания с транспозазами находятся на прямых повторах (DR), расположенных рядом с инвертированными. SB

транспозон специфично встраивается в ТА динуклеотидные сайты генома хозяина, его вставка приводит к дупликации ТА.

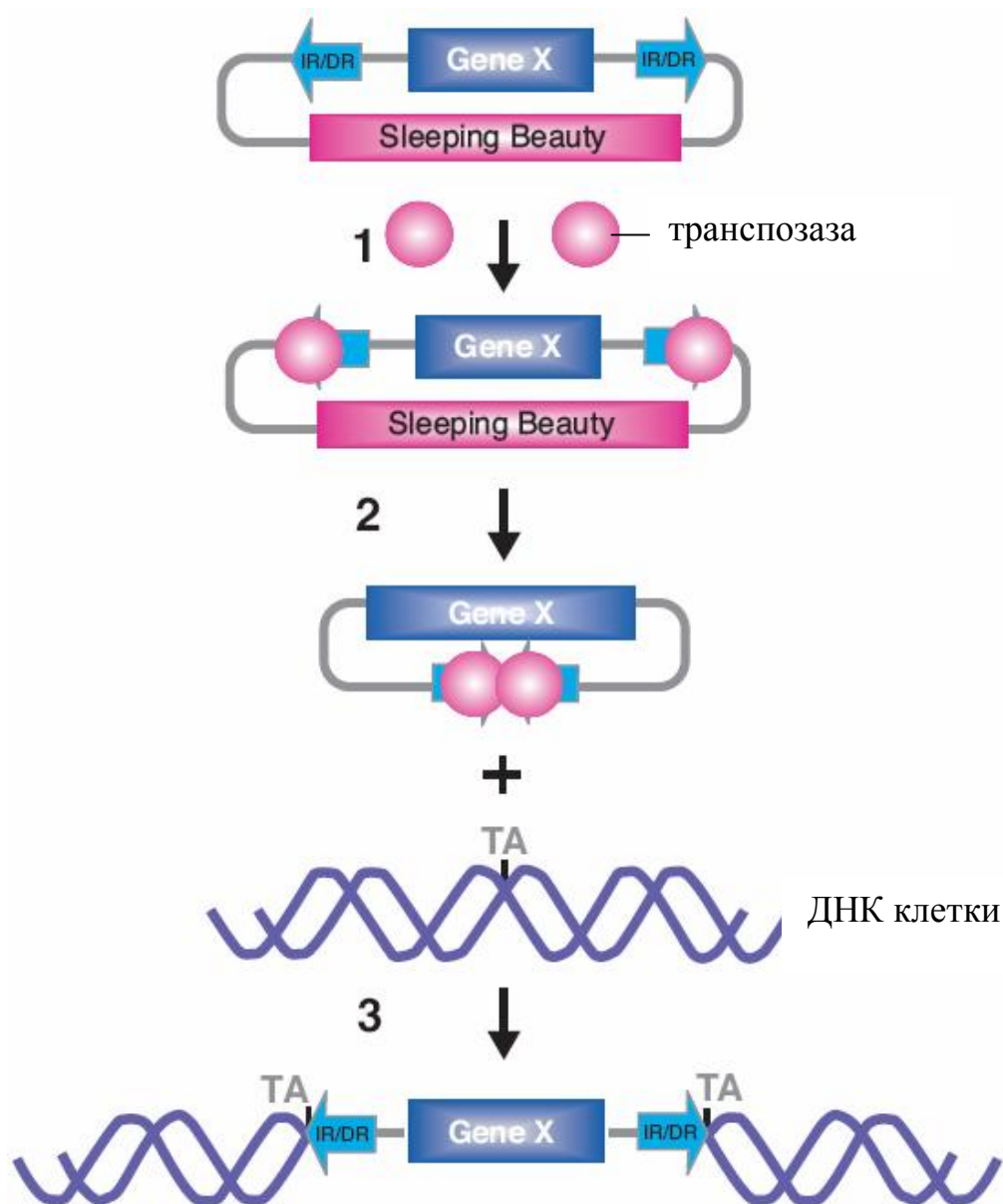


Рис. 14. Схема доставки терапевтического гена с использованием транспозона в генной терапии

Доставку терапевтического гена в клетку производят с помощью плазмидного вектора невирусной природы. Последовательность трансгена фланкируется IR/DR-последовательностями, необходимыми для связывания с транспозазой. Транспозаза может экспрессироваться последовательностью, встроенной или в ту же плазмиду или в отдельную. Транспозаза при связывании с IR/DR-сайтами катализирует вырезание фланкированного трансгена и последующую его интеграцию в геном хозяина.

Многие исследователи считают, что наиболее перспективным для целей генной терапии соматических клеток был бы *вектор, имитирующий хромосому человека*. Такие векторы создаются по типу природных хромосом, также как созданы дрожжевые искусственные хромосомы – YAC.

Такие хромосомы позволяют включать в нее протяженные сегменты чужеродной ДНК вместе с полным набором регуляторных элементов для одного или нескольких терапевтических генов. Возможность использования геномных вариантов терапевтических генов обеспечит высокую эффективность и длительность их экспрессии как в пролиферирующих, так и неделящихся клетках-мишенях. Для этого они должны содержать три функциональных элемента:

- участок, обеспечивающий репликацию (origin);
- центромеру – последовательность, обеспечивающую митотическую стабильность;
- концевые участки (теломеры) – последовательности, обеспечивающую правильную репликацию и устойчивость к нуклеазам.

В настоящее время уже получены и поддерживаются в трансфецированной культуре клеток стабильные искусственные хромосомы человека (микрохромосомы), состоящие из множества ДНК-повторов (длиной около 1000 т.п.н.) центромерной области Y-хромосомы, высокомолекулярных фрагментов геномной ДНК и теломерных участков. В их центромерную область был встроен маркерный ген устойчивости к неомицину.

Сконструировано три различные микрохромосомы человека. Две из трех микрохромосом были получены «усечением» обычной хромосомы. В одном случае исходная центромера была сохранена, а в другом заменена трансфецированной центромерной областью. Третью, полностью искусственную микрохромосому, получили лигированием трех трансфецированных ДНК-элементов.

2.1.2.2. Перенос генов с помощью липосом

Проблему проникновения ДНК-конструкций в клетку через липидный бислой клеточной мембраны можно решить, окружив их искусственной липидной оболочкой, образующей липидную сферу (липосому) с водным содержимым. Липосомы – микроскопические фосфолипидные везикулы, образованные одной или несколькими бислойными мембранами, которые служат транспортным средством для доставки химиопрепаратов, белков, пептидов, ДНК, антисмысловых олигонуклеотидов и т. д.

Созданы липосомы с самыми разными свойствами. Например, катионные (положительно заряженные) липосомы, которые связываются с отрицательно заряженной молекулой ДНК, образуя ДНК-липидный комплекс – *липоплекс*. Липоплексы легко образуются, могут нести достаточно крупные генетические конструкции, относительно нетоксичны и неиммуногенны. Кроме этого, липосомы характеризуются следующими свойствами:

- биосовместимость;
- защита включенных веществ;
- возможность доставки как гидрофобных, так и гидрофильных соединений;
- способность доставлять соединения в цитоплазму клетки-мишени.

С использованием липосом можно осуществлять направленную доставку трансгенов и других биологически активных молекул, основанную на создании конъюгатов липосом с антителами или другими лигандами. Конструкция, включающая моноклональные антитела, или Fab'-фрагменты моноклональных антител, получила название *иммунолипосома* (рис. 15).

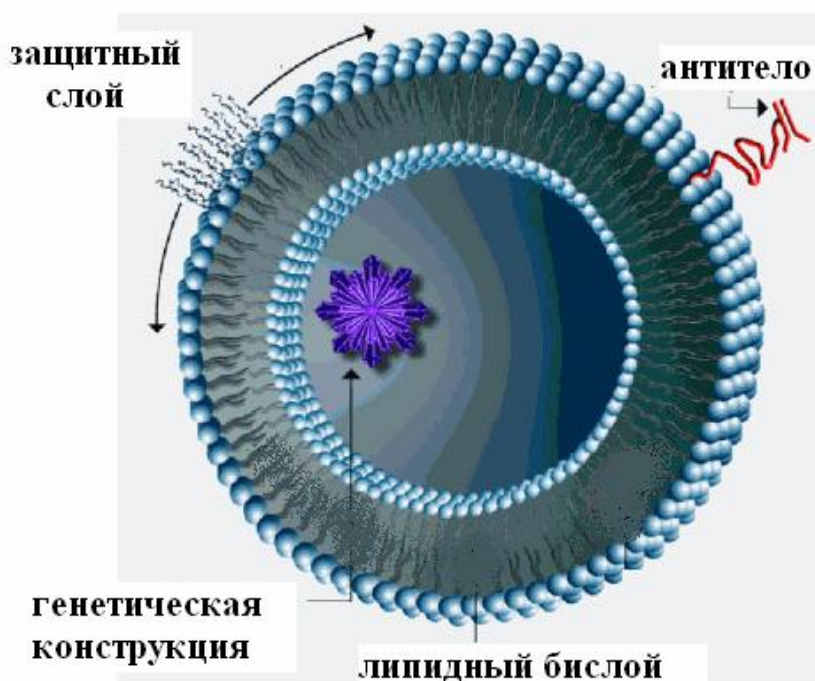


Рис. 15. Иммунолипосома

Например, иммунолипосомы, объединенные с антителами к антигенам главного комплекса гистосовместимости мышей, обладают значительно большей эффективностью доставки ДНК к соответствующим клеткам-мишеням, чем липосомы сами по себе. Для

направленной доставки ДНК к клеткам эритроидного ряда костного мозга, экспрессирующим на своей поверхности рецепторы трансферрина, применяли липосому, конъюгированную с пептидным лигандом трансферрина.

Использование в качестве лиганда RGD-содержащих пептидов (Arg-Gly-Asp), направленных к интегриновым рецепторам, привело к стократному увеличению эффективности трансфекции ДНК опухолевых клеток, экспрессирующих интегриновые рецепторы.

Несмотря на то, что липосомы широко используются для адресной доставки биомолекул, данная технология малоэффективна, так как липосомы не способны самостоятельно проходить через плазматическую мембрану и проникать в цитоплазму.

Одним из новых способов, повышающих эффективность переноса макромолекул в цитоплазму, является использование воссозданной оболочки вируса гриппа А человека (сем. Orthomyxoviridae). Пустая оболочка вируса гриппа, лишенная нуклеокапсида (включая геном), представляющая собой сферическую, монослойную везикулу размером ≈ 150 нм, получила название **виросомы**. Виросомы содержат функциональные гликопротеины вируса гриппа – гемагглютинин и нейраминидазу, встроенные в фосфолипидный бислой. Это позволяет виросоме осуществить природный механизм связывания с клеткой-мишенью, рецептор-опосредованный эндоцитоз и рН-зависимое слияние мембраны с мембраной эндосомы. В результате этого происходит высвобождение заключенных в виросому биологически активных молекул в цитоплазму.

Уникальные свойства виросом позволили использовать их в качестве транспортной системы не только для генетических конструкций, но и других биологически активных молекул – антибиотиков, цитостатиков, фунгицидов, антигенов. Это делает виросомы перспективным инструментом биомедицины для терапии опухолей, нейродегенеративных и инфекционных заболеваний.

2.1.2.3. Другие способы доставки генетических конструкций

Несмотря на все преимущества вирусные системы имеют ряд недостатков: они дорогостоящи, часто обладают ограниченной клонирующей емкостью, что не позволяет вводить дополнительные регуляторные последовательности для эффективной экспрессии терапевтического гена. Кроме того, вирусные системы могут вызывать воспалительные реакции, что исключает многократные повторные введения вектора. В связи с этим разрабатываются альтернативные невирусные системы доставки терапевтических генов.

Прямое введение ДНК-конструкций в клетки-мишени с помощью физических методов трансфекции, например электротрансфекции. Данный метод напрямую связан с электропорацией – созданием брешей (пор) в мембране клетки. Установлено, что воздействие на клетки импульсов электрического поля высокой напряженности (0,5-15 кВ/см, в зависимости от типа клеток) и различной длительности (10 мкс – 50 мс) ведет к обратимому увеличению проницаемости плазматической мембраны для малых ионов, низко- и высокомолекулярных веществ. Это происходит за счет образования в плазматической мембране пор диаметром 0,5 нм. Несоответствие пор небольшого диаметра и крупных молекул ДНК нивелируется воздействием электрического поля, которое оказывает мощное давление на ДНК и опосредовано на мембрану в области малой поры, расширяя и деформируя ее. Однако применение этого подхода на организменном уровне ограничено доступностью ткани для инъекций и необходимостью введения больших количеств ДНК. Например, ДНК при инъекции в скелетные мышцы мышцей проникает далеко не во все клетки, и экспрессия гена-репортера сохраняется только около 50 суток.

Другой физический метод введения в ткани генетических терапевтических конструкций – **метод баллистической трансформации** с использованием генной «пушки» (рис. 16).



Рис. 16. Генная пушка

Для наибольшего эффекта ДНК-конструкции конъюгируют с частицами золота или вольфрама диаметром 1–3 мкм. При таком введении рекомбинантная ДНК может проникать через ткани в ядра клеток. Введенные таким образом «терапевтические» гены экспрессируются в тканях-мишенях, а их продукты поступают в кровь. Однако, глубина проникновения генетических конструкций в ткани невелика, поэтому такие манипуляции проводят с клетками кожи или клетками подкожных опухолей, хряща и поперечно-полосатых мышц.

2.2. НЕГАТИВНАЯ ГЕНОТЕРАПИЯ

Часто при инфекциях или опухолевой трансформации заболевание вызывается избыточной функцией гена, несвойственной нормальной клетке. В таких случаях генная терапия направлена на подавление сверхактивного гена, или функции «больного» гена путем введения в клетки генетических конструкций, экспрессирующих факторы, которые тем или иным способом взаимодействуют с продуктом экспрессии нежелательного гена и нейтрализуют его вредный эффект.

2.2.1. Подавление функции гена на уровне мРНК

Терапия антисенс РНК. Эффекта подавления негативного гена можно достичь, поместив в клетку конструкцию, которая будет подавлять работу гена на уровне мРНК. Это может быть осуществлено с помощью экспрессии в клетке структур, обеспечивающих синтез РНК, комплементарной мРНК дефектного гена – антисенс РНК.

Примером генной терапии с помощью антисенс РНК являются эпизомные экспрессирующие векторы, в которые встроены комплементарные ДНК инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) или его рецептора, находящиеся в обратной ориентации под контролем металлотioneинового промотора. IGF-1 вырабатывается в избыточном количестве клетками злокачественной глиомы – наиболее распространенной опухоли головного мозга, а его рецептор – клетками карциномы предстательной железы.

Терапия антисмысловыми РНК. В 1978 году было показано, что олигонуклеотид, состоящий из 13 остатков и комплементарный матричной РНК вируса саркомы Рауса, может ингибировать репликацию вируса. Такая синтетическая РНК была названа антисмысловой. Будучи введенным в клетку, олигонуклеотид, комплементарный

определенной мРНК (например, вирусной мРНК, или мРНК онкогена), связывается с ней. В результате трансляция этой мРНК специфически ингибируется.

Идеологически эти два подхода сходны, но есть и существенная разница. Антисенс РНК постоянно экспрессируется клеткой, в которую для этого вводится специальная генетическая конструкция. Антисмысловую РНК вносят в клетку извне, кроме того, необходимы многократные введения, чтобы сделать действие этой терапии эффективным.

Терапевтический эффект синтетических антисмысловых олигонуклеотидов зависит от специфичности их гибридизации с доступным сайтом мРНК-мишени, устойчивости к действию клеточных нуклеаз и наличия системы доставки в клетку. Нуклеотидные последовательности размером 15–20 оснований гибридизуются с уникальными мРНК с достаточно высокой специфичностью.

Потенциальные сайты-мишени определяют тестированием набора «антисмысловых» олигонуклеотидов с использованием культуры клеток, синтезирующих мРНК-мишень. С этой целью проводят электрофоретическое разделение клеточных белков, в которые включают радиоактивную метку во время трансляции, и с помощью радиоавтографии устанавливают, в присутствии какого из антисмысловых олигонуклеотидов снижается синтез определенного белка. Общих критериев выбора наилучших сайтов-мишеней в разных РНК-транскриптах не существует. Эффективными могут оказаться олигонуклеотиды, комплементарные 5'- или 3'-концам мРНК, границам экзонов и интронов и даже двухцепочечным областям.

Для защиты от действия нуклеаз в антисмысловых РНК модифицируют пиримидиновые основания и дезоксирибозу. Заменяют свободный атом кислорода фосфодиэфирной связи на сульфогруппу, в результате чего образуется тиофосфорная связь. Синтезированы антисмысловые олигонуклеотиды с фосфорамидной и полиамидной связями. Химические группы, присоединенные к 2'-углеродному атому сахарного остатка и С₅-атому пиримидинов, также защищают антисмысловые РНК от действия нуклеаз и облегчают их связывание с сайтом-мишенью.

Доклинические испытания показали, что антисмысловые олигонуклеотиды могут быть эффективными лекарственными средствами при генной терапии стеноза коронарных и сонных артерий (пролиферация гладкомышечных клеток и секреция межклеточного вещества во внутренний слой артерий), приводящего к инфарктам и инсультам.

Генная терапия с использованием рибозимов. Еще одним способом подавления экспрессии гена на уровне мРНК является использование рибозимов – РНК, обладающих

ферментативными свойствами. В генной терапии применение рибозимов оправдано тем, что введение в клетку конструкции, кодирующей определенный рибозим, направленный на расщепление той или иной мРНК, не требует больших по объему и многократных введений, по сравнению с антисмысловыми РНК.

Создание «терапевтического» рибозима – сложный процесс. Связано это с трудностью получения больших количеств синтетических РНК и сохранения их в нативном состоянии в клетке-мишени. В одном из экспериментов синтезировали олигодезоксинуклеотид, который содержал каталитический домен (20 нуклеотидов), фланкированный гибридизующимися с мРНК-мишенью последовательностями (они же выступали в роли праймеров), амплифицировали его, встраивали в эукариотический экспрессирующий вектор и трансфецировали клетки полученной конструкцией. Образовавшийся после транскрипции рибозим, расщеплял мРНК-мишень и подавлял трансляцию белка, ответственного за развитие того или иного заболевания.

Природных ДНК-ферментов (*дезоксирибозимов*) пока не обнаружено, но уже синтезированы олигодезоксинуклеотиды, обладающие каталитической активностью. Преимущество дезоксирибозимов состоит в том, что для их получения не нужно использовать экспрессирующий вектор: ДНК-ферменты можно упаковывать в липосомы и доставлять в клетки-мишени.

Генная терапия днРНК. Другой способ негативной генотерапии на уровне мРНК основан на одном из механизмов клеточной защиты от вирусов и других возможных «покушений» на геном в форме трансгенов или транспозонов. В результате заражения вирусами в клетках образуется некоторое количество двунитевой РНК (днРНК). Источником днРНК могут быть:

- вирусы, геном которых представлен днРНК;
- вирусы, геном которых представлен однонитевой РНК (онРНК), в результате ее репликации образуется днРНК или при образовании вторичной структуры (шпилек);
- днДНК – в результате комплементарного слияния продуктов транскрипции двух разных цепей ДНК может образоваться днРНК.

днРНК активирует процессы, приводящие к блокаде экспрессии генов в результате гомологичной рекомбинации. Этот механизм получил название *интерференция РНК*. днРНК большой длины подвергаются расщеплению на более мелкие фрагменты длиной около 22 нуклеотидов – короткие интерферирующие РНК (киРНК). Ключевым ферментом

этой реакции является дайсер РНКаза III (от англ. dice – нарезать на кусочки), имеющаяся у различных организмов.

После образования киРНК, к ним присоединяются дополнительные белки, необходимые для формирования специфического мРНК-деградирующего эндонуклеазного комплекса (RISC). Этот комплекс присоединяется к комплементарным фрагментам синтезируемой чужеродной мРНК и расщепляет ее (рис. 17). Кроме того, получены данные о блокаде трансляции чужеродной мРНК с помощью РНК-белкового комплекса. За открытие процесса РНК-интерференции Эндрю Фаер и Крэйг Мэлло (США) в 2006 году получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

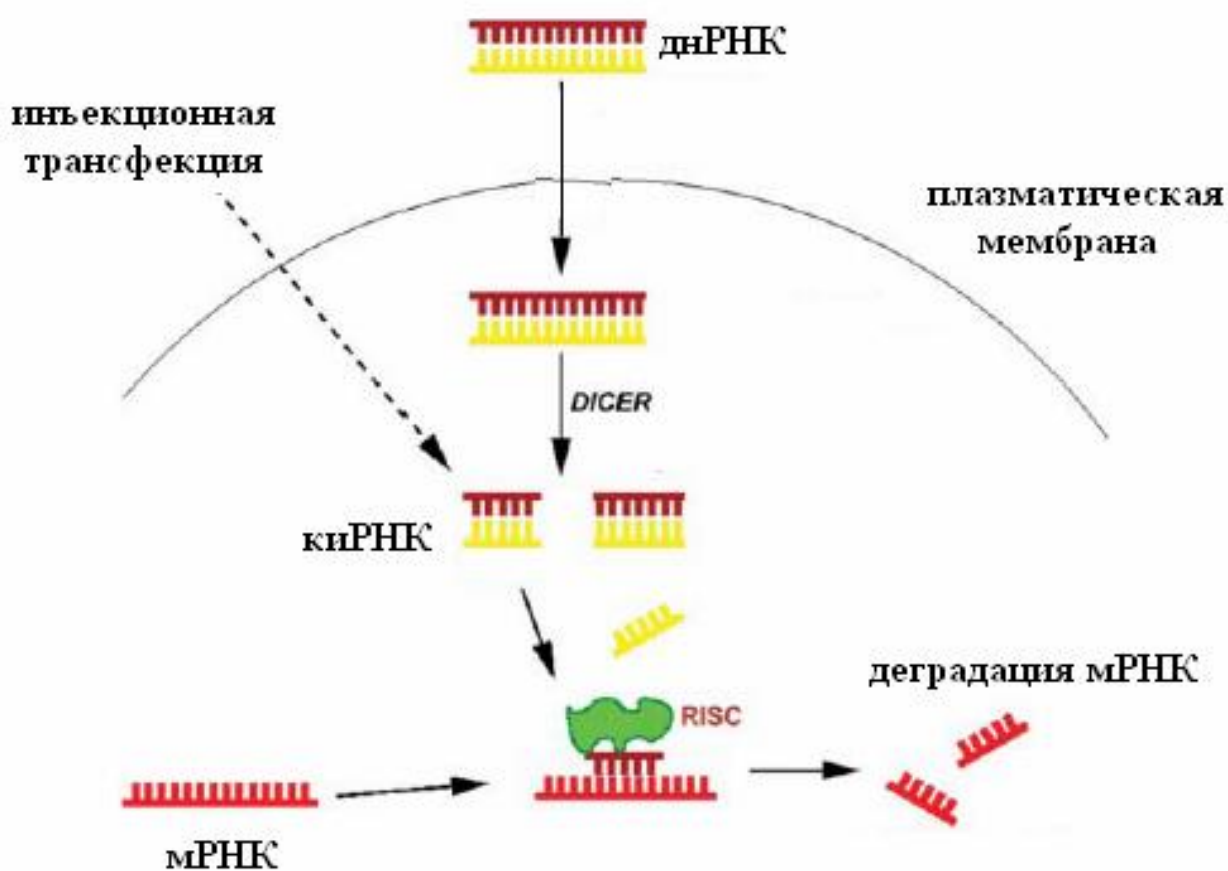


Рис. 17. Механизм РНК-интерференции

Открытие механизма РНК-интерференции привело к активизации многочисленных исследований по использованию днРНК в генной терапии. На первых этапах проводили эксперименты по интродукции в клетки длинных днРНК, которые приводили к запуску РНК интерференции. Однако было показано, что длинные днРНК очень часто вызывают неспецифическую активацию генов, кодирующих интерфероны. Такой исход не приведет

к специфической интерференции и блокаде определенных мРНК. Далее исследователи стали использовать уже химически или энзиматически синтезированные киРНК, тем самым, минуя этап их образования в клетке.

2.2.2. Подавление функции гена на уровне белка

Внутриклеточная иммунизация. Это один из способов подавления функции гена на уровне белка. Термин «внутриклеточная иммунизация» был предложен нобелевским лауреатом Дэвидом Балтимором. Внутриклеточная иммунизация может быть осуществлена двумя способами: введением в клетку генетической конструкции, экспрессирующей антитела для нейтрализации нежелательного белка, и введением собственно антител.

Молекулы антител слишком велики для внутриклеточного использования, в связи с этим осуществляют модификацию антител, объединяя переменные участки легкой и тяжелой цепей соединительным пептидом. Это существенно облегчает конструкцию и не отражается на связывании модифицированных антител с антигенами. Подобные конструкции получили название *одноцепочечных антител (intrabodies)* (рис. 18). К таким антителам могут быть присоединены различные сигнальные последовательности, которые будут направлять их в определенные клеточные структуры и компартменты.

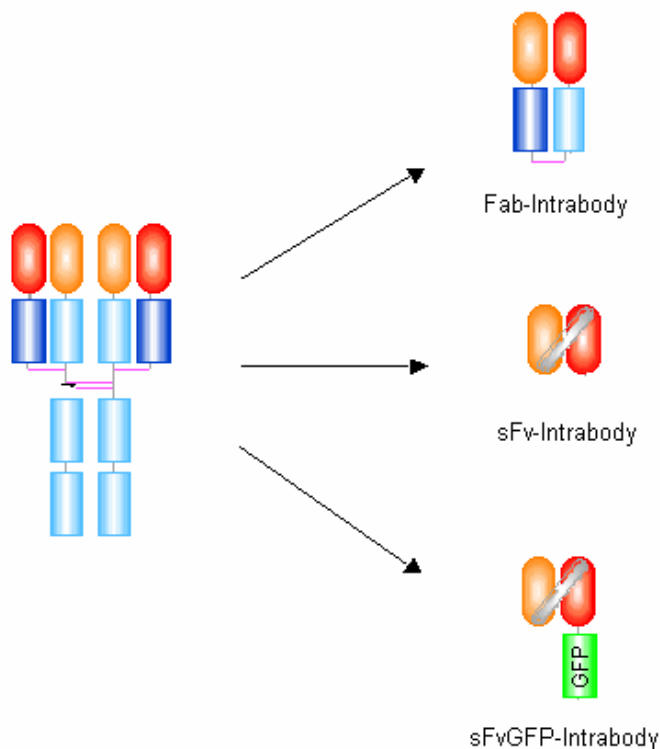


Рис. 18. Варианты одноцепочечных антител

Генная терапия с помощью аптамеров. Аптамеры представляют собой синтезированные *in vitro* олигонуклеотиды, способные связываться с белками. Такие аптамеры, присоединяясь к определенному белку, в норме не связанному ни с какими нуклеиновыми кислотами, блокируют его функцию.

Так, антитромбиновый аптамер может стать недорогим средством профилактики тромбообразования при различных хирургических вмешательствах. Для его получения использовали набор химически синтезированных олигонуклеотидов, состоящих из 18-нуклеотидных фланкирующих областей (праймеров) и центрального 60-нуклеотидного участка, представляющего собой случайную последовательность нуклеотидов. Образец пропустили через колонку, содержащую связанные молекулы тромбина, присоединившиеся к тромбину олигонуклеотиды элюировали и повторно пропустили через эту колонку. Эту процедуру повторяли несколько раз. Конечный набор тромбиновых аптамеров амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали, после чего определили физические и биологические свойства каждого из них. Те аптамеры, которые обладали высоким сродством, специфичностью и антитромбиновой активностью, отбирали для более детального анализа.

Таким образом был получен эффективный антитромбиновый аптамер. К сожалению, вследствие малого времени жизни *in vivo* его можно использовать только для временного ингибирования функции тромбина (например, при кардиопульмонарном шунтировании).

3. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

К 2005 году более 4500 болезней определены как генетически обусловленные заболевания. В настоящее время не существует единой общепринятой классификации генетически детерминированных, наследственных болезней. Это в значительной степени связано с трудностями, возникающими при выборе критерия, который должен быть положен в основу выделения отдельных групп и форм генетически обусловленных, наследственных заболеваний. В качестве одного из таких критериев можно было бы использовать общность патогенетических механизмов болезней. Однако такое деление может привести к тому, что в одну группу попадут патологии, различные по клиническим проявлениям, что значительно затруднит использование такой классификации врачами-клиницистами.

В последние годы в связи со значительными успехами, достигнутыми при изучении природы генетически обусловленных заболеваний, возникли все предпосылки для создания генетической классификации, основанной на различии в этиологии. Однако и в случае использования этой классификации возникают трудности. Они связаны с наличием гетерогенности, в результате которой может не наблюдаться прямой корреляции между генотипом и фенотипом. Нередко бывает, что идентичное по клиническим проявлениям заболевание может быть обусловлено мутациями в разных генах (локусная гетерогенность). В то же время, различные мутации в одном и том же гене в ряде случаев, могут детерминировать совершенно разные болезни (аллельная гетерогенность).

Кроме того, открытия второй половины XX века свидетельствуют о том, что наряду с наследованием болезней по классическим законам, существуют многочисленные отклонения от них в наследовании патологических признаков. Стало известно так называемое девиантное наследование (наследование генов только одного родителя); мутации генов соматических клеток, служащих причиной хронических заболеваний, не передающихся потомству; внеядерное наследование заболеваний (митохондриальные патологии) и т.д.

В общем виде рабочая классификация генетически детерминированных заболеваний по генетическому принципу может быть представлена в следующем виде:

1. Моногенные заболевания – болезни, обусловленные мутацией одного гена. Мутации могут возникать в смысловых или в регуляторных (0,1% моногенных заболеваний) участках гена и приводить к нарушению процессов транскрипции и

трансляции, что обуславливает уменьшение или прекращение синтеза белкового продукта или изменение его нормальной структуры и свойств. Чаще всего идентифицируются точковые мутации, представляющие собой однонуклеотидные замены и делеции:

- миссенс-мутации – замена нуклеотида в кодирующей части гена (при этом длина белка остается неизменной, меняется пространственная конфигурация, вследствие чего может нарушаться его функционирование);
- нонсенс-мутации – в результате замены нуклеотида в молекуле ДНК образуется стоп-кодон, прекращающий процесс трансляции (синтезируется укороченный белок с измененными функциями);
- сплайсинговые мутации – однонуклеотидные замены, возникающие на границе экзонов и интронов (нарушается процессинг первичного РНК продукта);
- нулевые мутации – замена нуклеотида с образованием стоп-кодона или сдвигом рамки считывания в 5'-области гена (отсутствие белкового продукта).

Наряду с точковыми мутациями довольно часто причиной моногенных заболеваний являются делеции и инсерции сегмента ДНК размером от одного нуклеотида до субхромосомного сегмента. Описаны заболевания, возникновение которых связано с инсерцией транспозоноподобных мобильных элементов генома. Если количество делетированных или вставленных нуклеотидов не кратно трем, рамка считывания генетического кода сдвигается, что приводит к образованию белка, не способного нормально функционировать.

Еще один тип мутаций, наследуемых моногенно, – это дупликация определенного участка хромосомы, включающая один или несколько структурных генов. Как правило, они возникают в результате неравного кроссинговера гомологичных хроматид.

В последние годы у человека описан новый тип мутаций, так называемые, динамические мутации. Они характеризуются увеличением количества тринуклеотидных повторов в регуляторной или кодируемой частях гена. Большинство моногенных заболеваний, при которых выявляются эти мутации, связаны с патологией нервной системы.

Согласно современным оценкам моногенные заболевания выявляются у 2,4% населения, а их средняя частота составляет 10:1000 новорожденных.

1.1. Моногенные болезни, наследующиеся по аутосомно-доминантному типу.
При данном типе наследования проявления заболевания связаны с мутацией единственного гена, переданного ребенку хотя бы от одного из родителей. Другими

словами, развитие болезни проявляется у гетеро- и гомозигот по патологической мутации. Мутантный ген передается от родителей к детям обоего пола с вероятностью 50%. В некоторых случаях наблюдается варьирующая экспрессивность (степень выраженности признака) мутантного аллеля в ряду поколений, а также нарастание тяжести заболевания у больных последующих поколений. Механизм доминантности, обуславливающий появление клинических симптомов при наличии лишь одной копии мутантного аллеля, до конца не расшифрован. Эффект доминирования определенного аллеля гена может возникать в том случае, если его продукт регулирует комплекс метаболических путей, служит ключевым ферментом в каскаде биохимических реакций или играет роль мембранного рецептора. Только часть случаев аутосомно-доминантных моногенных заболеваний обусловлена передачей гена родителями, имеющими этот ген в каждой клетке организма. Определенная доля этих заболеваний обязана своим появлением вновь возникшей мутации в единственной половой клетке одного из родителей. Эти заболевания чаще всего связаны с нарушением синтеза структурных белков организма – белков соединительной и костной тканей, белков клеточных мембран и крови.

1.2. Моногенные болезни, наследующиеся по аутосомно-рецессивному типу.

Данный тип наследования характеризуется проявлением заболевания у гомозигот по патологической мутации с ее передачей от здоровых родителей детям с вероятностью 25%. К развитию заболевания приводит наличие как одинаковых, так и различных патологических мутаций, в результате которых нарушается или прекращается функционирование белкового продукта, экспрессируемого определенным геном. По аутосомно-рецессивному типу наследуется подавляющее большинство ферментопатий, а также нарушения структуры и функции белков крови.

1.3. Моногенные болезни, наследующиеся сцепленно с полом. К этой группе относятся болезни, возникновение которых обусловлено мутациями в генах половых хромосом. Для большинства таких заболеваний характерен сцепленный с X-хромосомой тип наследования. Y-хромосома содержит небольшое число генов, мутации в которых приводят к развитию наследственных болезней, сопровождающихся нарушениям функционирования мужских половых желез. Для заболеваний, сцепленных с X-хромосомой, описаны рецессивный и доминантный типы наследования.

1.3.1. Болезни с X-сцепленным рецессивным типом наследования возникают у лиц мужского пола при наличии мутантного гена в гемизиготном состоянии. Женщины являются, как правило, передатчиками мутантного гена, который находится у них в гетерозиготном состоянии на одной из X-хромосом. В редких случаях отмечается

появление клинических признаков X-сцепленного рецессивного заболевания у женщин. Самое распространенное заболевание этой группы – прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна, а также гемофилии А, В и другие.

1.3.2. *Болезни с X-сцепленным доминантным типом наследования* встречаются крайне редко. В этом случае мутантный ген на X-хромосоме может проявляться как в гетерозиготном, так и гемизиготном состоянии. Одна из особенностей этих заболеваний заключается в разной тяжести клинической картины у больных женского и мужского пола. У женщин довольно часто встречается бессимптомное носительство или умеренная экспрессивность патологического гена, что можно объяснить корригирующим эффектом генов интактной X-хромосомы. У больных мужчин тяжесть заболевания значительно больше, при ряде заболеваний носители мужского пола гибнут еще во внутриутробном периоде. В качестве примера заболеваний этой группы можно привести моторно-сенсорные нейропатии.

2. *Митохондриальные болезни* – группа наследственных заболеваний, обусловленных нарушением структуры и биохимических процессов в митохондриях. Эти заболевания могут быть детерминированы мутациями как в митохондриальном, так и в ядерном геноме. Кроме того, имеется еще один механизм возникновения болезней митохондрий – межгеномные сигнальные эффекты. Известно, что синтез митохондриальной ДНК (мтДНК) находится под контролем ядерных генов, мутации в которых могут привести к изменению количества копий ДНК митохондрий – тканеспецифические делеции и дупликации. При мутациях в ядерных геномах отклонения от менделеевских типов наследования не происходит, в отличие от мутаций в мтДНК. В настоящее время показано, что все митохондрии человека имеют материнское происхождение и получены человеком с материнской яйцеклеткой. Клетки больного с митохондриальной патологией могут содержать мутантные и нормальные митохондрии, распределение которых происходит случайно при клеточном делении – феномен гетероплазмии. Тяжесть клинических проявлений зависит от характера мутаций, содержания мутантной мтДНК в клетке, а также от энергетической потребности различных органов и тканей. Скорость мутирования мтДНК в 6-17 раз выше, чем ядерной ДНК, что обуславливает высокую частоту спорадических случаев митохондриальных заболеваний.

3. *Болезни геномного импринтинга* – группа заболеваний с нетрадиционным типом наследования, в основе развития которых лежит различная экспрессия у потомства гомологичных генов, полученных от отца или матери. То есть экспрессируется только

отцовский или только материнский аллель гена, а другой оказывается функционально неактивным. Основную роль в возникновении геномного импринтинга играет избирательное метилирование цитозиновых оснований ДНК в процессе спермато- или оогенеза, в результате которого прекращается транскрипция импринтингового гена. Идентифицировано несколько механизмов возникновения болезней геномного импринтинга: однородительская дисомия – наличие двух хромосом с импринтинговыми генами, полученными от одного из родителей; хромосомные перестройки, затрагивающие импринтинговые гены, и точковые мутации в них. К настоящему времени выявлено не менее 30 импринтинговых генов, часто группирующихся в кластеры. Наиболее часто эффект геномного импринтинга выступает в качестве этиологического фактора при мутациях в хромосоме 15, с которыми связано развитие синдрома Прадера-Вилли и синдрома Энгельмана.

4. *Болезни экспансии тринуклеотидных повторов* – большой класс наследственных заболеваний, вызванных так называемыми «динамическими мутациями», которые характеризуются увеличением числа копий tandemных тринуклеотидных повторов в регуляторной или транслируемой части генов. Этот тип мутаций обнаружен пока только у человека. Для некоторых генов в норме характерно наличие определенного числа тринуклеотидных повторов, которое может варьировать от нескольких десятков до нескольких сотен. Появление клинических признаков наблюдается, когда количество повторов превысит критический для данного гена уровень. Заболевания этой группы характеризуются утяжелением клинических проявлений из поколения в поколение. По типу и локализации тринуклеотидных повторов в структуре генов эти патологии делят на две группы:

4.1. *Болезни экспансии тринуклеотидных повторов в транслируемой части гена* – чаще всего CAG-повторов, кодирующих глутамин, что приводит к включению в структуру экспрессируемого белка полиглутаминового участка. Количество этих повторов у больных обычно невелика и колеблется в интервале от 40 до 80. При этом транскрипция и трансляция мутантных генов не нарушена, а патология возникает в результате неправильного функционирования увеличенного в размере белка. К этой группе заболеваний относят наследственные нейродегенерации, характеризующиеся поздним началом и неуклонным прогрессированием.

4.2. *Болезни экспансии тринуклеотидных повторов в нетранслируемой части гена*. При этих заболеваниях наблюдается большая экспансия повторов (от нескольких сотен до нескольких тысяч), а характер клинических проявлений и темп прогрессирования

патологии зависит от функции мутантного белка. Значительное увеличение количества повторов делает ген нестабильным, как в соматических, так и в половых клетках. К заболеваниям этой группы можно отнести миотоническую дистрофию, синдром Мартина-Белл, атаксию Фридрейха.

5. Хромосомные синдромы – являются следствием структурных или количественных перестроек хромосом. Клинические проявления при хромосомных нарушениях наблюдаются с рождения, кроме того, до 50% всех спонтанных абортов обусловлены наличием хромосомных перестроек у плода. Аномалии хромосом достаточно часто возникают, как в половых, так и в соматических клетках человека. Характер и тяжесть клинических симптомов при различных типах хромосомных перестроек определяется степенью нарушения генетического баланса и, как следствие, гомеостаза в организме человека. Недостаток хромосомного материала приводит к более выраженным клиническим проявлениям, чем его избыток. Для большинства хромосомных синдромов, обусловленных аномалиями аутосом, характерны пренатальная гипотрофия, пороки развития двух и более органов и систем, олигофрения и снижение показателей физического развития. Для аномалий половых хромосом не характерно наличие выраженного интеллектуального дефицита, при этом возникает бесплодие и невынашивание беременности. Хромосомные синдромы делят на две группы:

5.1. Геномные мутации – характеризуются увеличением полного набора хромосом (полиплоидии) или изменением количества хромосом одной из пар (анеуплоидии). У человека описано два вида полиплоидий: триплоидии и тетраплоидии с трех- и четырехкратным увеличением числа гаплоидных наборов хромосом, соответственно. Анеуплоидии могут выражаться в увеличении числа хромосом одной пары (трисомии и тетрасомии) и в их уменьшении (моносомии). Полиплоидии, как правило, не совместимы с жизнью, также как и моносомии по всем аутосомам. Наиболее частые геномные мутации у живорожденных – трисомии по ааутосомам и половым хромосомам и моносомии по X-хромосоме.

5.2. Хромосомные мутации – обуславливают различные изменения структуры хромосом. Они характеризуются значительным разнообразием и могут затрагивать одну или несколько хромосом. Выделяют внутри- и межхромосомные перестройки. Внутрихромосомными могут быть делеции, дупликации, транслокации и инверсии. Именно эти хромосомные перестройки при различных видах патологии человека. К межхромосомным перестройкам относятся транслокации и инсерции. Основными межхромосомными перестройками являются транслокации, которые могут быть

реципрокными (сбалансированными – весь генетический материал сохраняется, а изменения касаются только расположения генов) и робертсоновскими (две хромосомы объединяются в одну).

6. Полигенные (мультифакториальные) заболевания – для их возникновения необходимо сочетанное действие нескольких генетических и средовых факторов. По мнению некоторых ученых мультифакториальные болезни составляют до 90% всех хронических заболеваний человека, так или иначе связанных с генетическими факторами. Такие заболевания более сложны для генетического анализа, поскольку обусловлены мутациями в нескольких генах, каждая из которых не является причиной патологии, а их появление сильно зависит от модифицирующего влияния факторов внешней среды и качества жизни. Частота встречаемости таких заболеваний обычно выше. Наблюдается огромный клинический полиморфизм заболеваний. Проявления этих заболеваний зависят от возраста больного, эндокринных влияний, питания и других факторов как внешней, так и внутренней среды (онкологические заболевания, бронхиальная астма, гипертония, сахарный диабет, ожирение, дерматозы, аутоиммунные заболевания и др.).

Для многих генных болезней известен первичный аномальный продукт гена. Эта группа заболеваний может быть классифицирована в зависимости от того, какие белки поражены:

- Структурные белки (синдром Эмерса-Данлоса, при котором изменена молекулярная структура коллагена; миодистрофия Дюшенна (результат мутации гена мышечного белка дистрофина);
- Транспортные белки (чаще всего мутации в генах, кодирующих мембранные транспортеры аминокислот; гемоглобинопатии, пернициозная анемия);
- Белки-рецепторы (ахондроплазия – обусловлена мутацией в гене рецептора гормона роста);
- Ферменты. Большинство генетических болезней относится к группе энзимопатий, связанных с врожденной недостаточностью определенного фермента, возникающей вследствие мутации кодирующего гена. Энзимопатии подразделяются на болезни накопления липидов, углеводов, аминокислот и других веществ. Единой классификации энзимопатий пока нет. Рабочая классификация, одобренная научной группой ВОЗ, подразделяет эти генные заболевания на:
 - Болезни аминокислотного обмена (фенилкетонурия, гистидинемия);

- Наследственные нарушения обмена углеводов (галактоземия, гликогенозы);
- Нарушения липидного обмена (амавротические идиотии – болезнь Тея-Сакса, идиотия Нормана-Вуда, идиотия Баттена-Шпильмейера-Фогта-Шегрена, форма Куфса; болезнь Ниманна-Пика; лейкодистрофии – Шольца-Гринфилда, Краббе-Бенеке, Пелицеуса-Мерцбахера);
- Наследственные болезни стероидного обмена;
- Наследственные болезни пуринового и пиримидинового обменов (подагра, синдром Леш-Нихана);
- Наследственные нарушения порфиринов (порфирия).

Одной из групп генетических болезней являются первичные иммунодефициты. Большинство первичных иммунодефицитов проявляется на первом году жизни. В настоящее время их идентифицировано около 80, они так или иначе связаны с дефектом одной из составляющих иммунной системы. Эти заболевания разделены на несколько групп:

- иммунодефициты, связанные с дефектами неспецифического иммунитета (фагоциты, натуральные киллеры, система комплемента);
- дефекты специфического гуморального иммунитета (В-лимфоциты, антитела);
- комбинированные иммунодефициты клеточного и гуморального иммунитета;
- иммунодефициты, ассоциированные с другими генетическими мутациями.

Большинство обычных болезней современного общества, такие как рак, атеросклероз, нейропсихиатрические болезни имеют существенный генетический компонент и также могут рассматриваться, как объекты классической генной терапии.

В настоящее время генная терапия внедряется и в область инфекционных заболеваний. Мишенью генной терапии стали такие заболевания, как ВИЧ-инфекция, гепатит В, мононуклеоз, герпес и др.

К 2000 году в мире зарегистрировано 380 клинических протоколов генной терапии. Из них 68% приходится на генную терапию злокачественных новообразований; 13,9% – на моногенные наследственные заболевания; 8,2% – на терапию инфекционных болезней.

3.1. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Недостаточность аденозиндезаминазы – моногенное аутосомно-рецессивное заболевание. Дети с этим наследственным дефектом гомозиготны по поврежденному гену и обычно не имеют аденозиндезаминазы (ADA), а гетерозиготные родители имеют пониженное содержание фермента. Ген ADA, кодирующий фермент аденозиндезаминазу, расположен на хромосоме 20. Этот фермент катализирует превращение аденозина в инозин и аммиак. Дефектность по этому ферменту приводит к тяжелому комбинированному иммунодефициту (SCID), связанному прежде всего с недоразвитием Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток. Часто это заболевание сопровождается нарушениями в развитии скелета.

Недостаточность аденозиндезаминазы успешно лечилась пересадкой костного мозга. Наблюдения за пациентами, получавшими такое лечение, показали, что у них собственные Т-клетки часто замещались донорскими, т.е. донорские клетки обладали селективными преимуществами перед собственными, больными. Именно поэтому в качестве первой модели для генной терапии была выбрана недостаточность аденозиндезаминазы. Мишенью генной терапии являются лимфоциты и клетки костного мозга.

Генная терапия недостаточности ADA была осуществлена путем модификации лейкоцитарных клеток. Это была первая успешная попытка применения терапии *ex vivo*. Она была осуществлена 14 сентября 1990 года. Эта дата считается днем рождения реальной генной терапии.

При генной терапии больной с недостаточностью ADA была использована следующая схема лечения. С помощью лейкофореза из периферической крови выделяли моноклеарные клетки, затем их растили в культуре в условиях пролиферации Т-клеток. Для этого использовали антитела, стимулирующие деление Т-клеток, и фактор роста лимфоцитов – интерлейкин-2. Затем в пролиферирующие в условиях *in vitro* клетки вводили ретровирусный вектор, который содержал нормальный ген ADA. Через несколько дней трансдуцированные клетки крови вводили обратно пациентке. Процесс повторяли 7 раз на протяжении 10 месяцев. После введения генетически модифицированных клеток произошло заметное улучшение работы иммунной системы, наблюдалось повышение уровня аденозиндезаминазы. Примерно четверть лимфоцитов пациентки после терапии оказались носителями нормального гена ADA. За пациенткой наблюдали полгода и затем с интервалами 3-5 месяцев повторяли введение модифицированных клеток.

При данном протоколе генной терапии использовали зрелые Т-лимфоциты, средняя продолжительность жизни которых невелика, так как они постоянно замещаются в организме новыми. В связи с этим существует необходимость повторять введение генетически модифицированных клеток многократно.

В настоящее время генная терапия данного заболевания развивается в направлении использования стволовых клеток пациента. Это позволит значительно сократить количество введений модифицированных клеток за счет их многократных делений уже в самом организме и при достижении селективного и количественного преимущества модифицированных стволовых клеток над нативными сформирует достаточный уровень фермента в организме.

Наследственная тирозинемия первого типа – моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное дефектом гена фумарилацетоацетатгидроксилазы (FАН). Сопровождается нарушением функций печени разной степени выраженности вплоть до гепатоклеточной карциномы.

Разработка подходов к лечению данного заболевания ведется пока на животных. Создана технология получения трансгенных мышей с нокаутированным геном FАН, которые моделируют наиболее острую форму тирозинемии. Мышей, больных тирозинемией, подвергали терапии, направленной на уменьшение гепатотоксичности. Это удлиняло продолжительность жизни мышей, но впоследствии приводило к развитию гепатоцеллюлярной карциномы. То же самое наблюдается у пациентов, страдающих тирозинемией.

Была высказана гипотеза, что гепатоциты, в которых будет экспрессироваться нормальный фермент FАН, должны иметь преимущества в скорости роста по сравнению с гепатоцитами, в которых этот ген не функционирует. Действительно, трансплантация больной нокаутированной мыши всего 1000 гепатоцитов, взятых от здоровой мыши, экспрессирующей нормальный фермент FАН, приводила к потрясающему результату: в печени больного животного появлялось очень большое количество нормальных гепатоцитов. При введении через кровь гепатоцитов, трансфецированных здоровым геном, результат был аналогичным. Больное животное приобретало нормальную функцию печени. Таким образом, генетически модифицированные клетки, несущие здоровый ген, постепенно вытесняли немодифицированные гепатоциты.

Наследственная гиперхолестеролемиа – моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, связанное с дефектом гена, кодирующего рецептор липопротеинов низкой плотности (LDL-R). Повреждение гена приводит к отсутствию данного рецептора на клетках печени и, как следствие, к накоплению в организме холестерина. Возникает ранний атеросклероз, что может привести к инфаркту миокарда.

У пациента, страдающего гиперхолестеролемией, была проведена частичная гепатэктомия. Известно, что неделящиеся гепатоциты не могут быть инфицированы ретровирусами. После гепатэктомии гепатоциты начинают пролиферировать и приобретают способность инфицироваться ретровирусами.

В гепатоциты, полученные из печени больного, с помощью ретровирусного вектора была введена кДНК гена нормального рецептора LDL-R. После реинфузии рекомбинантных гепатоцитов через воротную вену в печень наблюдалось уменьшение содержания в крови липопротеинов низкой плотности (в частности, холестерина) и соотношения липопротеинов низкой плотности к липопротеинам высокой плотности. Это означает, что введенные клетки функционировали *in vivo* и осуществляли интернализацию и обмен холестерина.

Фенилкетонурия – моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, является следствием дефекта гена, кодирующего фермент фенилаланингидроксилазу, обнаруживается по наличию в моче кетокислоты фенилпирувата. В результате отсутствия фермента фенилаланин не может превращаться в тирозин, что является причиной гиперфенилаланинемии. Следствием этого дефекта является умственная отсталость, которую можно предотвратить путем специальной диеты.

Использование генной терапии при этом заболевании осложняется тем, что фенилаланингидроксилаза требует для своей активности кофакторов, которые синтезируются в печени. В настоящее время ведутся исследования на животных моделях, применимых для разработки методов генной терапии фенилкетонурии.

Гемофилия В – моногенное X-сцепленное заболевание свертываемости крови, вызываемое дефицитом фактора свертываемости крови IX, который синтезируется в печени и секретируется в кровь.

Были проведены успешные опыты на собаках с использованием стратегии *ex vivo* с доставкой в гепатоциты кДНК, кодирующей фактор IX. Удалось добиться синтеза

фактора IX в количествах, составляющих 0,1% от нормального количества фактора IX в плазме крови.

Для повышения концентрации фактора IX были предприняты попытки терапии *in vivo* с доставкой кДНК в гепатоциты с помощью аденовирусного вектора. Оказалось что такой вектор может трансдуцировать гепатоциты *in vivo* без гепатоэктомии. При этом рекомбинантный вектор вводили в воротные сосуды подопытных собак, дефицитных по фактору IX. Концентрация фактора у больных собак возрастала от 0 до 300% от первичного уровня, и кровь этих животных нормально свертывалась. Однако, через несколько дней уровень фактора IX в крови начинал падать, но при этом оставался выше исходного в течение последующих двух месяцев. Эти эксперименты дают основание надеяться, что подобный подход, при условии его усовершенствования, может быть применен и к больным гемофилией В.

Гемофилия А – моногенное X-сцепленное заболевание свертываемости крови, вызванное мутацией гена, кодирующего фактор свертываемости крови VIII. Исследования в области генной терапии гемофилии А осложняются тем, что ген имеет большие размеры. Это препятствует встраиванию полноразмерной кДНК в ретровирусные векторы. Кроме того, кДНК этого фактора содержит ингибиторные последовательности, которые препятствуют экспрессии ретровирусного генома.

Дополнительные молекулярно-генетические исследования показали, что фактор VIII построен по доменному принципу. Он состоит из 6 доменов А1-А2-В-А3-С1-С2. Домен В можно исключить из белка без потери функциональной активности. Следовательно, можно использовать укороченный ген, совместимый по длине с емкостью имеющихся векторов.

Появились сообщения об успешном введении мышам укороченного гена фактора VIII в составе ретровирусного вектора. В результате достигается терапевтический уровень фактора в крови.

Муковисцидоз - моногенное аутосомно-рецессивное заболевание легких, вызванное мутацией гена CFTR, являющегося регулятором трансмембранной проводимости клеток легочного эпителия. Наличие мутации приводит к хроническим инфекциям, воспалениям и постепенному разрушению дыхательного аппарата. Показано, что замена 6-10% клеток легочного эпителия трансфецированными клетками позволит восстановить нормальные транспортные функции трансмембранных каналов, обеспечивающих перенос ионов хлора.

Использование ретровирусных векторов при генной терапии данного генетического заболевания неэффективно, поскольку они плохо инфицируют легочный эпителий. Взамен используют аденовирусы и липосомы. Эксперименты по применимости и безопасности подобных подходов проверены на мышах, нокаутированных по CFTR гену. Однако, они не всегда давали ожидаемы результат. Так, использование аденовирусных векторов довольно часто приводило к развитию различного рода воспалительных реакций.

Важной проблемой генной терапии муковисцидоза являются сложности, связанные с доставкой терапевтического гена непосредственно к клеткам легочного эпителия. Доставка вектора осложняется наличием многочисленных барьеров, образованных серозной оболочкой, гликокаликсом. Основу этих барьеров составляют плотные адгезионные контакты между клетками, которые не позволяют крупным молекулам проходить через слои клеток. Были разработаны два подхода, направленные на решение этой проблемы. Один из них называется «модификация хозяина». Он предполагает использование различных веществ (оксиданты, детергенты), которые вызовут неспецифическое повреждение плотных контактов, что позволит генотерапевтическим векторам проходить сквозь слои клеток к месту назначения. Однако, этот подход осложняется сложностью расчета концентраций этих веществ.

Второй подход заключается в модификации вектора, который включает в себя определенный лиганд к рецептору на поверхности клеток легочного эпителия (рис. 19).

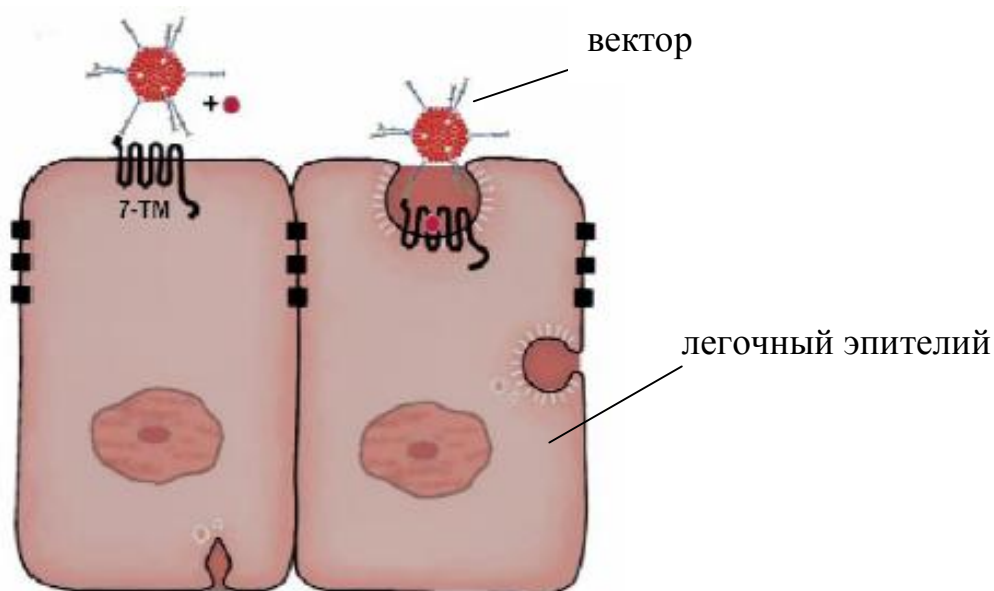


Рис. 19. Модификация вектора для внедрения в клетку-мишень

Взаимодействие лиганда с рецептором обычно приводит к интернализации вектора вместе с рецептором внутрь клетки. В качестве такого рецептора был выбран трансмембранный рецептор P2Y₂-R, семь раз пересекающий плазматическую мембрану. Этот рецептор участвует в запуске каскада воспалительных реакций в полости легких. В качестве лиганда использовались либо моноклональные антитела к этому рецептору, либо природный лиганд – биотинУТФ.

Мышечная дистрофия Дюшенна – это рецессивное X-сцепленное заболевание, обусловленное многочисленными делециями и инсерциями в области гена, кодирующего белок дистрофин. Дистрофин локализуется в сарколемме мышечных волокон и ответственен за стабилизацию плазматической мембраны миоцитов. Дисфункция этого белка приводит к дестабилизации мембран и последующей дегенерации мышечной ткани. Болезнь начинает проявляться в детстве, и генная терапия должна проводиться в это же время.

Существуют животные, которых используют в качестве модели заболевания – мыши и собаки с аналогичной болезнью. В процессе исследований подсчитано, что по крайней мере 10% мышечных клеток должны получить ген дистрофина, чтобы лечебный эффект был достигнут.

Использованы подходы с доставкой кДНК гена дистрофина с помощью аденовирусов. Кроме того, применяли «голую» кДНК, содержащую ген дистрофина. Преимущество применения аденовирусов в качестве векторов заключается в их тропизме к неделящимся мышечным клеткам. В связи с тем, что ген дистрофина очень большой по длине (14 т.п.н.) и белок, который он кодирует также велик (4000 а.о.) исследователи пытаются использовать укороченные, но тем не менее функционально активные формы белка. Эксперименты на мышинных моделях, которые имеют дефектный ген дистрофина, показали, что от 5 до 50% мышечных клеток экспрессировали усеченный белок дистрофин. Этого было достаточно для сведения к минимуму мышечной дегенерации.

Существуют данные о клинических испытаниях генетической конструкции, несущей ген дистрофина, для терапии больных мышечной дистрофией Дюшенна. Больные дети после инъекции в мышцы такой конструкции приобретали способность двигаться. Однако, терапевтический эффект был временным.

Наследственные повреждения сетчатки. Из различных наследственных форм дегенерации сетчатки наиболее охарактеризован пигментозный ретинит – чаще всего, моногенное аутосомно-рецессивное заболевание. Причиной этой болезни являются мутации в одном или нескольких из семи RP-генов. Пять из них экспрессируются исключительно в фоторецепторных клетках. Однако, фоторецепторные клетки и пигментные эпителиальные клетки находятся в непосредственной близости и функционально взаимосвязаны. Дефекты в генах, экспрессирующихся в пигментных клетках, могут также вызывать дегенеративные повреждения сетчатки. Введение в клетки нормальных копий дефектных генов или генов, способствующих клеточному выживанию, может блокировать дегенеративный процесс и таким образом сохранять зрение.

Глаз имеет множество преимуществ как мишень для осуществления генотерапевтических процедур. Он легко доступен, его ткани могут быть исследованы *in vivo* с помощью офтальмоскопии. Кроме того, имеется несколько гематоофтальмических барьеров, которые могут концентрировать генотерапевтические векторы в целевой области и ограничивать их распространение вне глаза.

Однако, генная терапия наследственных повреждений сетчатки имеет сложности, связанные с необходимостью длительной экспрессии и правильного регулирования трандуцированного гена. Проводятся многочисленные эксперименты по генной терапии различных наследственных моногенных ретинитов. Исследования по восстановлению фоторецепторных клеточных популяций на мышинных моделях пока не привели к должным результатам. Введение терапевтического гена способствовало восстановлению нескольких слоев фоторецепторов, однако через несколько недель трансформированные клетки погибали.

Лучших результатов достигли с генной терапией пигментных клеток. В частности удалось восстановить зрение у мышей с ретинитом, в основе которого лежит дефект гена, кодирующего фермент, расщепляющий липофусцин. Также успешными можно назвать генотерапевтические стратегии, использующие в качестве трандуцированного гена факторы роста для фоторецепторных клеток – нейротрофический фактор мозгового происхождения (BDNF) и цилиарный нейротрофический фактор (CNTF).

3.2. ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Раковые заболевания и создание эффективных методов их лечения – одна из основных проблем современного общества. Не случайно задачам диагностики и лечения рака уделяют большое внимание во всех развитых странах. Поэтому скорость приближения к

реальной генной терапии рака весьма значительна. Это связано с двумя факторами, один из которых научный, а другой социально-этический. Первый заключается в том, что с опухолевыми клетками сравнительно легко работать *ex vivo* и *in situ*. Это их очень большое преимущество, поскольку они легко размножаются.

Второй фактор связан с тем, что рак настолько опасен и в большинстве случаев так быстро прогрессирует, что применение новых подходов для спасения обреченных на близкую смерть людей совершенно оправданно с этической точки зрения.

Рак это, как правило, следствие многоступенчатых изменений клетки. Сложность, связанная с участием множества генов и их продуктов в опухолевом процессе, вызывала сомнения в эффективности генной терапии раковых заболеваний. Однако, существуют многочисленные эксперименты, показывающие, что компенсация единственного гена-супрессора может приводить к подавлению опухолевых свойств клеток.

В настоящее время существует несколько потенциальных стратегий борьбы с раковыми опухолями методами генной терапии.

Усиление противоопухолевой активности клеток иммунной системы. Первые клинические исследования по генной терапии рака начались в 1989 году. В качестве объекта были использованы Т-лимфоциты, инфильтрующиеся в опухоль (ТИЛ). ТИЛ брали у онкологических пациентов и с помощью ретровирусного вектора вводили в них ген устойчивости к неомицину. Модифицированные ТИЛ растили в культуре в присутствии фактора роста Т-лимфоцитов ИЛ-2. Затем Т-лимфоциты вводили пациентам. Клинические исследования показали безвредность введения генетически модифицированных Т-лимфоцитов. Однако, осталось неясным, насколько специфично лимфоциты мигрируют в опухоль.

Дальнейшие эксперименты велись также с ТИЛ, но в качестве терапевтического гена брали ген, кодирующий фактор некроза опухолей (ФНО). ФНО представляет лимфокин, который оказывал сильный противоопухолевой эффект, что было подтверждено в опытах на мышах. Однако, при экстраполировании этих экспериментов на человека, введение ФНО оказывалось очень токсичным для организма в целом. Но несмотря на первые неудачи, клинические испытания с использованием ТИЛ для генной терапии опухолей активно ведутся вплоть до настоящего времени, также как и дискуссии на тему эффективности такого подхода.

Другой подход предполагает изменение функционирования клеток-эффекторов при помощи генов, кодирующих химерные рецепторы. Такие рецепторы включают

вариабельные домены противоопухолевых моноклональных антител и константные участки цепей Т-клеточного рецептора. При экспрессии таких рецепторов распознавание опухоли и последующая активация цитотоксических Т-клеток не зависят от антигенов гистосовместимости.

Еще одно направление связано с клонированием и размножением *ex vivo* Т-лимфоцитов, несущих гены, которые кодируют Т-клеточные рецепторы, направленные против опухолевых антигенов.

Увеличение иммуногенности опухолевых клеток, например, путем введения генов, кодирующих продукты, обеспечивающие распознавание опухоли клетками иммунной системы (цитокиновых генов, генов, кодирующих главный комплекс гистосовместимости и др.). Небольшое число попыток генотерапии злокачественных опухолей связано с введением в клетки опухоли генов IL-2 или ФНО. Затем эти клетки вводили в организм больного, что обеспечивало иммунологическую реакцию на опухолевые клетки. Такие манипуляции проводили для лечения больных злокачественной меланомой, раком почки.

Проводятся работы по введению в опухолевые клетки генов, кодирующих белки-иммуностимуляторы. Клетки выращивают в культуре, затем облучают и вводят обратно пациенту в надежде вызвать системный иммунный ответ. Он, с одной стороны, уничтожает уже существующие опухолевые клетки, а с другой – предохраняет от возникновения новых опухолей данного типа. Повышение концентрации цитокинов в непосредственной близости от опухолевых клеток стимулирует мигрирующие в опухолевый очаг Т-клетки. Стимулирующие эффекты наблюдались как у опытных животных, так и у пациентов-волонтеров, получивших такую терапию.

Представленные исследования дали начало развитию нового направления противоопухолевой терапии – терапии с применением индивидуальных противоопухолевых вакцин. Первые эксперименты проводились на мышах. Клетки опухолей трансформировали генами таких цитокинов, как: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , GM-CSF, гамма-интерферон. Наблюдали, что у животных, которым вводили генетически модифицированные опухолевые клетки, происходило торможение опухолевого роста. В ряде случаев животные становились невосприимчивыми к возникновению новых опухолевых очагов при введении немодифицированных опухолевых клеток. Таким образом, трансдуцированные клетки действовали, как противоопухолевые вакцины. Это послужило основанием для испытания подобных подходов на людях. В настоящее время

предпринимаются попытки «включать» гены цитокинов с помощью ретровирусных векторов в клетки меланомы, различных карцином, нейробластомы, рака груди.

Другой подход в создании противораковых индивидуальных вакцин заключается в следующем. Ранее считалось, что для узнавания и последующей иммунной реакции достаточно только взаимодействия Т-клеточного рецептора и комплекса пептида с молекулами HLA I класса. Оказалось, что для полноценного иммунного ответа необходимо наличие дополнительного сигнала. Этот сигнал образуется путем взаимодействия молекулы B7 на поверхности антигенпредставляющей клетки и ее рецептора на поверхности Т-клетки, называемого CD28 антигеном.

Причиной того, что опухолевые клетки не узнаются клетками иммунной системы может быть то, что они обычно не экспрессируют на поверхности B7. В связи с этим были предприняты попытки стимулировать противоопухолевый ответ путем введения гена B7 в опухолевые клетки. Подобным образом были модифицированы меланомные мышинные клетки. Их введение мышам с меланомой приводило к деградации опухоли, и ни одна из мышей, получивших дозу клеток модифицированной меланомы, не погибла. Более того, если мышам, вакцинированным модифицированными меланомными клетками, вводили немодифицированные клетки меланомы, то 89% мышей оказывались защищенными от развития опухоли. Это означает, что вакцина способна защищать от метастазирования.

Еще один потенциальный способ противоопухолевой терапии связан с блокадой механизмов, с помощью которых опухолевые клетки избегают уничтожения клетками иммунной системой. Многие опухоли синтезируют большие количества инсулинподобного ростового фактора – IGF-1. Экспрессию этого гена можно подавить путем введения в опухолевые клетки генетических конструкций, кодирующих антисмысловую РНК, т.е. РНК, комплементарную по отношению к мРНК гена IGF-1. Такая РНК взаимодействует с мРНК этого ростового фактора и препятствует ее трансляции. Опухоли, образуемые такими модифицированными клетками, разрушаются иммунной системой.

Восстановление нормального фенотипа клеток. Для этого осуществляют блокаду экспрессии онкогенов с помощью внутриклеточной иммунизации, например, путем введения в клетки конструкций, программирующих синтез антисмысловых РНК или антител к онкобелкам. Ведутся исследования по использованию внутриклеточных антител для инактивации рецепторов ростовых факторов, которые вовлекаются в опухолеобразование. К числу таких рецепторов относится ErbB2. Он принадлежит к

семейству рецепторов эпидермального ростового фактора EGFR. Функционально это семейство представляет собой семейство рецепторов с тирозинкиназной активностью, которая имеет ключевое значение для регуляции жизнедеятельности клетки. Этот рецептор повышенно экспрессируется на клетках ряда опухолей (карцинома яичника, молочной железы). На культурах клеток продемонстрировали, что внутриклеточные антитела к этому рецептору, заякоренные в эндоплазматическом ретикулуме, предотвращали его появление на поверхности клеток и приводили к приостановке клеточной пролиферации. Наблюдали и обращение трансформированных клеток к нетрансформированному фенотипу.

Кроме того, проводили эксперименты и с цитоплазматическими внутриклеточными антителами. Для этого кодирующую последовательность лишали той части, которая отвечает за экспрессию лидерного пептида. Использовали, в частности, антитела против продукта гена *ras*. Это p21^{ras} белок, связывающий гуанозиннуклеотиды и вовлеченный в многочисленные процессы контроля клеточного роста и дифференцировки.

Введение в опухолевые клетки генов онкосупрессоров, таких как p53, также способствует восстановлению нормального фенотипа опухолевых клеток.

Направленное убийство опухолевых клеток. Это может осуществляться путем введения генов, кодирующих токсины под контролем промоторов, специфически экспрессирующихся в опухолевых клетках. Например, гена, кодирующего дифтерийный токсин.

Другой недавно разработанный генотерапевтический подход заключается в использовании штамма аденовируса, кодирующего дефектный белок E1B. Этот белок с молекулярной массой 55 кДа в обычных условиях обладает сродством к одному из основных онкосупрессоров p53. При взаимодействии с ним он блокирует его действие. В результате генетического дефекта E1B в сайте взаимодействия с p53 при попадании в нормальные клетки не происходит нарушения активности p53 и дальнейшего развития вируса. Большинство опухолевых клеток несет мутации именно в гене, кодирующем белок p53, поэтому при попадании аденовируса в эти клетки блокады репликации аденовируса не происходит. Вирус размножается и осуществляет свое цитопатическое действие. Этот подход был отработан на животных моделях и в настоящее время используется в клинических целях, обычно в сочетании с дополнительной химиотерапией.

Терапия, инициирующая апоптоз опухолевых клеток. Апоптоз клетки можно запустить с помощью многих факторов. Например, апоптоз можно вызвать, усилив чувствительность клетки к повреждениям ДНК. Этому способствует введение генетических конструкций, усиливающих или запускающих подавленную или полностью отсутствующую в опухолевых клетках экспрессию клеточных белков (p53, E2F-1).

К запуску самоубийства клеток приводит введение непосредственно проапоптотических генов – генов, кодирующих предшественников каспаз; генов, чьи продукты блокируют ингибиторы апоптоза (IAP); генов, кодирующих участников митохондриального пути апоптоза (Araf-1, Bax).

Ведутся эксперименты по блокаде антиапоптотических белков (Bcl-2, Bcl-X_L) с помощью внутриклеточных антител, антисмысловых олигонуклеотидов и интерферирующей РНК. Последние исследования показывают, что причиной большинства случаев образования карциномы прямой кишки является повышенная экспрессия Bcl-2, способствующая снижению экспрессии онкосупрессора p53.

Введение в опухолевую массу лигандов для мембранных рецепторов апоптоза приводит опухолевые клетки к гибели. Наилучшие результаты в доклинических исследованиях получены при использовании рекомбинантного лиганда TRAIL, который, в отличие от Fas-лиганда и TNF- α , не оказывал токсичного действия на окружающие ткани. Часто многие опухолевые клетки имеют пониженную экспрессию рецепторов апоптоза, в частности DR4-рецепторов для TRAIL. Поэтому генную терапию с помощью TRAIL предваряют терапией, способствующей повышению экспрессии DR4-рецепторов (повышенная экспрессия p53, блокада ингибиторов апоптоза IAP и Smac/Diablo).

Большинство опухолей устойчивы к действию цитотоксических препаратов. Одной из составляющих, способствующему этому, а также препятствующему запуску апоптоза, является каскад реакций, индуцированный фактором транскрипции NF- κ B. Поэтому была разработана соответствующая генная терапия протеолитически стабильным «суперрепрессором» этого каскада I κ B, который повышает чувствительность некоторых видов опухолей к химиотерапии, TNF- α . Подобный эффект оказывают ингибиторы протеасом, протеинкиназы С.

Одним из важных подходов в рамках апоптотической стратегии генной терапии является «суицидальная» GDEPT-терапия (gene directed enzyme prodrug therapy). Эта терапия способствует повышению чувствительности раковых клеток к апоптозу с помощью нетоксичных предшественников противоопухолевых препаратов.

Апоптоз пролиферирующих клеток можно вызвать с помощью препарата ганцикловир, который оказывает токсичное действие на быстроделящиеся клетки. Он представляет собой активированный продукт гена тимидинкиназы вируса простого герпеса.

Для апоптоза опухолевых клеток их сначала заражают вирусом простого герпеса, несущего ген тимидинкиназы, а затем через некоторое время вводят ганцикловир. Тимидинкиназа вируса фосфорилирует ганцикловир.

Киназы клетки-хозяина присоединяют к фосфорилированному ганцикловиру трифосфат, а трифосфаты затем включаются во вновь синтезированную ДНК в процессе синтеза ДНК при клеточном делении. Включившись, они обрывают дальнейший синтез ДНК, терминируют его, что приводит к запуску апоптотических сигналов. В результате клетки, содержащие герпесную тимидинкиназу, погибают в присутствии этих агентов. Через межклеточные контакты ганцикловиртрифосфат может попасть в другие опухолевые клетки и привести к их гибели.

Подобные эксперименты вначале велись на животных моделях. Клетки мышинных фибробластов, продуцирующие рекомбинантные ретровирусы подсаживались прямо в опухоль в мозге. Рекомбинантные ретровирусы содержали ген HSVtk. Поскольку ретровирусы интегрируют в митотически активные клетки, ген тимидинкиназы оказывался преимущественно в опухолевых клетках, тогда как здоровые клетки из тканей, окружающих опухоль, оставались вне вирусной атаки и, следовательно, без гена тимидинкиназы герпеса.

На крысах был получен великолепный результат. От 30 до 60% опухолевых клеток в мозге оказывались обладателями гена HSVtk после такой обработки. У 80% подопытных крыс опухоли разрушались в присутствии ганцикловира. Гибель всей опухоли можно объяснить эффектом рядом стоящего (bystander). Погибают не только клетки, включившие ген тимидинкиназы герпеса, но и соседние с ними клетки, в которых этого гена нет, но которые делятся. По-видимому, дело в межклеточных взаимодействиях. Фосфорилированный ганцикловир может диффундировать от клеток, в которых он образуется за счет работы вирусной тимидинкиназы, к соседним клеткам. Если соседние клетки делятся, то они будут его включать в состав ДНК и погибать. Экспериментально показано, что если 10% клеток опухоли содержит ген тимидинкиназы, то опухоль может быть уничтожена полностью. И при этом у животных не наблюдается токсических эффектов.

Полученные результаты позволили начать испытания на больных раком мозга, которым инъецируют мышинные фибробласты, продуцирующие рекомбинантные ретровирусы, содержащие ген HSVtk, а затем внутривенно вводили ганцикловир.

3.3. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). ВИЧ (HIV-1 от англ. Human Immunodeficiency Virus type 1) относится к сем. Retroviridae, роду Lentivirus, приводит к развитию синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), который сопровождается резким уменьшением количества лимфоцитов вообще и Т-хелперов в частности.

Вирионы ВИЧ имеют размер 100-120 нм, покрыты липопротеиновой оболочкой. Наружная поверхность вириона имеет 80 грибоподобных выступа ($d=15$ нм, $h=9$ нм). Выступы образованы тетрамером белка gp120, ковалентно связанным с двумя гликопротеинами gp41. Оболочка вируса с внутренней стороны выстлана матриксным белком p17, образующим изометрическую структуру. Внутренний компонент вириона представлен спиральным РНП, заключенным в капсулу. Капсула состоит из белка p24 и имеет форму груши, поскольку РНП расположен эксцентрично (вирион В-типа).

Гликопротеины gp120 и gp41 являются основными протективными антигенами вируса и несут в общей сложности более 10 антигенных детерминант. gp120 и gp41 - поверхностные белки, играющие определяющую роль в проникновении вируса в клетку.

gp120 – это прикрепительный белок, служащий лигандом клеточных рецепторов вируса. Рецепторами являются молекула CD4, выполняющая роль “фиксатора” вируса, и рецепторы для ряда хемокинов. Поскольку тропизм к конкретным типам клеток обеспечивается соответствующими хемокиновыми рецепторами, не все CD4-положительные клетки, инфицируются ВИЧ. Чувствительными к ВИЧ являются Т-лимфоциты, моноциты и макрофаги и некоторые другие клетки. Небольшое количество gp120 может произвольно отделяться от вириона и попадать в кровь и ткани в виде растворимой субстанции.

gp41 – белок слияния. Этот белок участвует в трех процессах:

- слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной;
- слияние соседних участков клеточных мембран;
- слияние мембран соседних клеток.

Первый из этих процессов обеспечивает проникновение вируса в клетку. gp41 индуцирует слияние мембран при нейтральных значениях рН. Слияние ВИЧ с мембраной клетки приводит к проникновению вируса в клетку, дезинтеграции вируса и выбросу РНП

ВИЧ в цитоплазму. Здесь РНК подвергается транскрибированию с помощью обратной транскриптазы в двухнитевую ДНК, которая транспортируется в ядро и с помощью интегразы встраивается в геном. Теоретически вирион может проникать в клетку и путем эндоцитоза и путем прямой пенетрации.

Геном ВИЧ, так же, как и у других ретровирусов, представлен двумя молекулами РНК позитивной полярности размером 9200 н.о. В вирионе РНК ассоциирована с нуклеокапсидным белком, ревертазой и интегразой. РНК кэпирована, полиаденилирована и каждая ассоциирована с лизиновой тРНК. Геном содержит гены *gag*, *pol*, *env* и *minigene*, но отличается от других ретровирусов тем, что гены *pol* и *env* не перекрываются, а отделены друг от друга рядом регуляторных генов (Рис. 29). Другой отличительной особенностью организации генома ВИЧ является наличие регуляторных генов, названных *трансактиваторами*. Они расположены на некотором расстоянии от генов, на которые воздействуют. Трансактиваторы усиливают работу структурных и NS генов более чем в 100 раз.

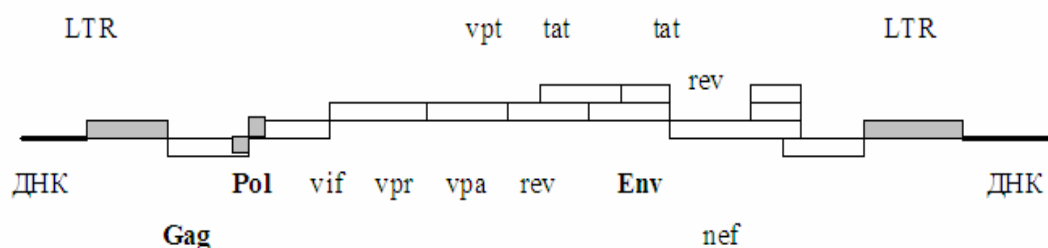


Рис. 20. Генетическая организация провируса ВИЧ

Репликация ВИЧ идет по схеме, характерной для ретровирусов, и включает стадию обратной транскрипции (синтез кДНК происходит в цитоплазме в составе РНП), транспорт кДНК в ядро и ее интеграцию в геном клетки. В состоянии латентного провируса ВИЧ может находиться до 10-15 лет без проявления клинических симптомов заболевания. Лиц, содержащих ВИЧ в латентном состоянии, называют ВИЧ-инфицированными. Активация провируса приводит к репликации вируса и развитию клинических проявлений инфекции, заканчивающейся летально. При активации провируса ВИЧ-инфекция переходит в заболевание, названное синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД).

Активация провируса приводит к транскрипции полноразмерных геномных РНК, часть которых в процессе сплайсинга образует мРНК gag, gag-pol и env и ряд коротких субгеномных РНК. Основные субгеномные РНК транслируют **полипротеины-предшественники**, которые затем нарезаются вирус-специфическими и клеточными протеазами на функциональные белки. Продукт гена gag нарезается вирус-специфической аспарагиновой протеазой на 4 белка - p17 (матриксный белок), p24 (капсидный белок), p7 и p9 (белки нуклеокапсида). Продукт гена gag-pol, состоящий из протеазы и ревертазы, расщепляется на функциональные белки-ферменты за счет аутокаталитической активности протеазы. Продукт гена env (gp160) нарезается клеточной трипсиноподобной протеазой на поверхностные белки p120 и p41, которые после нарезания гликозилируются в аппарате Гольджи.

Сборка вирионов ВИЧ осуществляется на цитоплазматической мембране, куда транспортируются поверхностные белки. Матриксный белок, ассоциированный с капсидным белком, заякоривается на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны за счет своего миристилированного N-конца. Спиральный нуклеокапсид собирается в цитоплазме самостоятельно и почкуется через мембрану в местах скопления матриксного белка.

Как уже отмечалось, gp41 обеспечивает слияние клеток изнутри. При достижении определенной концентрации этого гликопротеина на мембране клетки происходит слияние мембран соседних клеток, что приводит к образованию многоядерных синцитиев, которые включают десятки, и даже сотни лимфоцитов. Клетки, входящие в состав синцития погибают. Цитопатическое действие вируса оказывает только на Т-лимфоциты, что постепенно приводит к их количественному уменьшению. Моноциты являются резервуаром вируса, так как вирус может длительное время персистировать в ядре, не нанося ущерба этим клеткам.

ВИЧ характеризуется очень высокой скоростью изменчивости, которая в 10 раз превышает скорость мутаций у вируса гриппа и в 100 раз – скорость мутаций клеточных ДНК. В процессе репродукции ВИЧ в организме за счет высокой изменчивости происходит образование и накопление нескольких подтипов вируса (квазивидов). Это придает вирусу селективные преимущества в борьбе за выживание под прессом иммунной системы, позволяя уходить от иммунологического надзора. Скорость образования квазивидов как правило выше скорости формирования эффекторных клонов иммунокомпетентных клеток хозяина (Т- и В-лимфоциты). В результате даже здоровая иммунная система не в состоянии бороться с ВИЧ-инфекцией.

ВИЧ-инфекция приводит к поражению всех основных звеньев иммунитета, в результате развиваются оппортунистические инфекции и опухолевые заболевания (чаще всего саркома Капоши, карцинома, В-клеточная лимфома). ВИЧ также проникает в клетки центральной нервной системы, что часто приводит к различным проявлениям слабоумия.

Таким образом, наряду с общими для всех ретровирусов свойствами, ВИЧ-1 имеет особенности, которые ставят его в особую категорию ретровирусов:

- не вызывает злокачественной трансформации клеток;
- геном вируса чрезвычайно вариабелен;
- скорость мутирования ВИЧ в миллион раз выше, чем у млекопитающих, и составляет 10^{-4} – 10^{-3} мутаций на одну пару оснований на один цикл репликации;
- имеет сложную систему регуляции и обладает для этого специальным регуляторными генами: *rev*, *tat*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpr*.

ВИЧ-ассоциированный СПИД – необычное инфекционное заболевание, поскольку в этом случае вирус интегрирует с геномом клетки и остается там до ее гибели. То есть, СПИД, как и рак, является болезнью генома. Именно поэтому в данном случае большие надежды возлагаются на генную терапию. Знакомство с частным примером генотерапии ВИЧ-инфекции позволит понять общие подходы к генотерапии вирусных заболеваний.

Для борьбы с вирусом иммунодефицита генная терапия используется на нескольких уровнях:

- на уровне нуклеиновых кислот,
- на уровне белков,
- на уровне иммунотерапии.

Первые исследования в этой области шли с применением антисмысловых транскриптов (АТр) против регуляторных вирусных генов *rev*, *tat*, *vpr*, структурного гена *gag* и праймерного сайта. Было проанализировано несколько АТр, направленных против десяти различных регионов генома ВИЧ. Установлено, что наибольшим противовирусным эффектом обладали: анти-*gag* транскрипт (1 kb) и нуклеотидный фрагмент против *rev* и *tat* генов.

Основное ограничение в использовании антисмысловых нуклеотидов для подавления ВИЧ – это необходимость их длительного присутствия в клетке в большом количестве. Лишь при соотношении антисмысловых РНК к генам ВИЧ, равном 5:1 или 10:1, наблюдается эффективное ингибирование репликации вируса.

Стандартные генотерапевтические векторы, содержащие промоторы для полимеразы II (*pol II*) не продуцируют больших количеств антисмысловых РНК. Для решения этой проблемы используют альтернативные промоторные системы для полимеразы III, которые способствуют значительно большей экспрессии антисмысловых олигонуклеотидов и других терапевтических последовательностей.

В генной терапии ВИЧ также используют рибозимы. На модельных клетках изучены свойства нескольких различных рибозимов. Первый из них, направленный против *gag*, заметно снижал уровни экспрессии РНК и самого продукта этого гена. Второй рибозим, направленный против 5'-лидирующей последовательности ВИЧ, подавлял репликацию вируса. Третий рибозим, обладающий сходным сродством, также подавлял репликацию, а кроме того, инактивировал интеграцию вирусной РНК в геном клетки-хозяина. Транскрипты рибозимов имеют небольшие размеры, поэтому в один генотерапевтический вектор могут быть встроены несколько рибозимов, направленных против различных участков гена или против отдельных генов. Однако высокая скорость мутаций ВИЧ ограничивает использование рибозимов.

В генной терапии на уровне нуклеиновых кислот существует подход, действие которого не лимитируется сильной изменчивостью ретровирусов – это использование РНК-«приманок» или олигонуклеотидных ловушек. РНК-«приманки» представляют собой последовательности РНК, соответствующие регуляторным элементам генома вируса. При их введении идет конкуренция за взаимодействие с белками-активаторами.

В качестве таких белков-активаторов у ВИЧ выступают Tat (86-101 а.о.) и Rev (116 а.о.). Оба белка после образования транспортируются в ядро, где и осуществляют свои функции. Tat-белок чрезвычайно сильно активирует экспрессию вирусных генов за счет взаимодействия с регуляторным элементом вирусной РНК – TAR (Tat Response). Эта последовательность из 59 н.о. образует особую вторичную структуру, в которой двуцепочечные «стебли» чередуются с одноцепочечными петлями. Активация экспрессии приводит к увеличению содержания и самого Tat и другого трансаактиватора, Rev. Вновь синтезированный белок Rev направляется в ядро и связывается с регуляторным элементом RRE (Rev Responsive Element), копии которого находятся в составе мРНК различных генов вируса. Связывания мРНК с Rev необходимо для ее транспорта из ядра в цитоплазму. Если Rev белок отсутствует, транспорт нуклеопротеина не происходит или происходит очень медленно, так что мРНК задерживаются в ядре и не успевают подвергнуться сплайсингу.

Использование TAR-«приманок» ингибировало активацию транскрипции и заметно снижало репликацию ВИЧ в Т-клеточной линии более чем на 30 дней. Терапия полимерными TAR-«ловушками» лимфоцитов, выделенных из крови больных СПИД на поздней стадии инфекции эффективно ингибировала репликацию ВИЧ.

Повышенная экспрессия RRE-«ловушек» в составе ретровирусных векторов в клетках Т-клеточной линии также приводила к долговременному ингибированию репликации вируса иммунодефицита.

Обнаружены трансдоминантные мутантные формы регуляторных белков Rev и Tat, а также некоторых структурных белков – Gag и Env. Экспрессия этих трансдоминантных негативных белков (TNP) не поддерживает репликацию вируса, при этом также не давая своим нормальным, немутантным аналогам выполнять свои функции, если они присутствуют в клетке вместе. Это происходит вследствие конкуренции мутантных и нормальных белков за свой субстрат или кофактор. Если мутантный белок заменяет свой аналог в составе каких-нибудь мультимерных белковых комплексов, такие комплексы также оказываются дефектными.

Были созданы различные варианты ретровирусных векторов на основе TNP Rev и Tat, которые имели различную способность подавлять репликацию ВИЧ в модельных системах. Наилучший результат показал генотерапевтический вектор, экспрессирующий мутантные последовательности обоих этих регуляторных белков. Кроме того, был сконструирован химерный белок из двух мутантных Tat и Rev – Trev, экспрессия которого также снижала ВИЧ-репликацию.

В генной терапии ВИЧ-инфекции используют векторы, содержащие вставку нуклеотидной последовательности, кодирующей растворимую форму мембранного рецептора Т-хелперов CD4. Именно при взаимодействии с этим рецептором посредством белка gp120 (Env) вирус иммунодефицита проникает в Т-лимфоциты. Однако применение таких векторов ограничивается тем, что для нейтрализации ВИЧ необходимы очень большие уровни растворимого CD4 в клетке.

Введение в зараженные клетки внутриклеточных одноцепочечных антител, направленных против CD4-связывающего домена gp120, ингибирует репликацию ВИЧ путем захвата gp160 в эндоплазматическом ретикулуме и препятствует в последующем его кливевке до gp120 и gp41 белков. Также используются антитела против регуляторных белков ВИЧ и обратной транскриптазы.

Использование генетических вакцин является важной стратегией в лечении СПИДа. Цитотоксические лимфоциты выделяют с целью насильственного «обучения» с помощью

антигенпрезентирующих клеток, несущих в составе своих молекул гистосовместимости различные антигенные вирусные пептиды. Данные антигенпрезентирующие клетки были созданы путем трансфекции в них ретровирусных векторов с различными генами ВИЧ.

Сконструировали химерный Т-клеточный рецептор, который распознает ВИЧ-инфицированные клетки за счет находящегося в его составе CD4 или распознающего домена одноцепочечных антител, связанных с ξ -цепью этого рецептора. Данный рецептор интродуцировали в CD8-лимфоциты, в результате чего получали лимфоциты, способные распознать инфицированную клетку, связываться с ней, синтезировать цитокины и лизировать клетку.

Гепатит С-инфекция.

Вирус гепатита С (*Flaviviridae, Hepacivirus*) – РНК-содержащий вирус. В настоящее время в мире насчитывается до 500 млн. инфицированных вирусом гепатита С, что характеризует вирус как один из наиболее распространенных вирусных патогенов.

Вирусные частицы имеют оболочку, содержатся в крови в следовых количествах и ассоциированы с липопротеинами низкой плотности и антителами к белкам HCV. Вирусы, выделенные из комплексов с липопротеинами и анти-HCV антителами, имеют диаметр 60-70 нм. При электронно-микроскопическом изучении на поверхности вириона выявлены хорошо выраженные выступы высотой 6-8 нм.

HCV инфицирует не только гепатоциты, но и лимфоциты. Рецептором HCV на В-лимфоцитах является молекула TAPA-1 (CD81 антиген), входящая в состав В-клеточного корецептора и относящаяся к тетраспанам, то есть белкам, 4 раза пронизывающим мембрану. Кроме того, известно, что HCV проникает в клетки в составе частиц, образуемых липопротеинами низкой плотности. Липопротеины взаимодействуют с соответствующими рецепторами, локализованными в окаймленных ямках на поверхности клеток, и затем поглощаются внутрь клеток.

Геном вируса состоит из однонитевой РНК позитивной полярности длиной 9,4-9,5 т.н. Геном имеет одну открытую рамку считывания и кодирует полипротеин длиной 3008-3037 а.о. в зависимости от генотипа вируса. Кроме различий в длине генома и полипротеина, у разных изолятов вируса выявлена высокая гетерогенность генома на уровне нуклеотидной последовательности. Различия связаны с высокой скоростью мутаций вирусного генома и могут достигать 30 %. Изоляты вируса, геном которых имеет различия, достигающие 30 %, относят к разным генотипам. Выявлено, по крайней мере, 6 различных генотипов и более, чем 30 субтипов вируса. Между субтипами различия

нуклеотидной последовательности достигают 15 %. Инфицирование организма вирусами разных генотипов приводит к развитию гепатита с разной тяжестью течения. В России наиболее распространены генотипы 1b (плохо поддается терапии интерфероном-альфа) и генотип 3a.

На 5'- и 3'-концах генома вируса находятся нетранслируемые регионы (НТР). 5'-НТР состоит из 340 н.о., отличается высокой консервативностью и образует упорядоченную вторичную структуру, состоящую из нескольких шпилек. Функция 5'-НТР заключается в инициации трансляции. Специфически связываясь с рибосомами и факторами трансляции клетки-хозяина, он направляет рибосому к иницирующему кодону AUG в позиции 342, после чего начинается синтез полипротеина.

Полипротеин процессируется комбинацией вирусных протеиназ и протеиназ клетки-хозяина. Идентифицировано 10 белков, на которые расщепляется полипротеин. В первой трети полипротеина, начиная с N-конца, локализованы структурные белки, ближе к C-концу – неструктурные. Непосредственно на N-конце полипротеина локализован core-белок, формирующий вирусный капсид. Он освобождается из полипротеина за счет клеточных протеиназ и имеет гидрофобную C-концевую последовательность. Внутри клетки core-белок локализован на мембране ЭПР, а также в ядре клетки. Ядерный core-белок супрессирует отдельные гены клетки-хозяина. Цитоплазматический core-белок специфически подавляет апоптоз инфицированных клеток, обеспечивая длительную персистенцию вируса. Core-белок изменяет также клеточный метаболизм триглицеридов в гепатоцитах. В результате развивается стеатоз (жировое перерождение печени). При образовании нуклеокапсида происходит мультимеризация core-белка и его взаимодействие с вирусной РНК.

Гликопротеины E1 и E2 освобождаются из полипротеина за счет действия сигнальных пептидаз клетки-хозяина. Белки высоко гликозилированы. С белком E2 иногда ассоциирован небольшой протеин p7. При сборке вириона E1 взаимодействует своим C-концом с core-белком, а E2 – с NS2-протеином. При этом E1 и E2 образуют комплексы, сшитые дисульфидными связями. Образование комплексов происходит внутри ЭПР с участием шаперона калнексина.

E2 регион генома HCV является наиболее варибельным регионом. Варибельность является следствием беспорядочных мутаций. В ходе постоянно идущего мутационного процесса отбираются мутанты, способные уклоняться от действия нейтрализующих антител, продуцируемых иммунной системой хозяина. Скорость мутаций настолько велика, что в организме одного и того же HCV-инфицированного индивидуума возникает

множество вариантов вируса, отличающихся от родительского варианта. Такие варианты называют квазивидами. Основная часть возникающих мутаций связана с гипервариабельным участком E2-протеина, расположенным между 383 и 414 а.о.

NS2 протеин является трансмембранным белком. Его С-конец смотрит в просвет цистерн ЭПР, N-конец смотрит в цитозоль. NS2 протеин является цинк-зависимой протеазой, разрезающей NS2 и NS3 белки, то есть это аутопротеаза. При расщеплении белков освобождается N-конец NS3, что является важным моментом в репликации HCV.

NS3 белок выполняет несколько различных функций. Во-первых, он участвует в процессинге полипротеина, являясь сериновой протеазой, отщепляющей от полипротеина все неструктурные белки. Причем отщепление NS3 от NS4A является аутокаталитическим процессом. Во-вторых, NS3 белок играет важную роль в репликации вируса, обладая хеликазной и нуклеотидтрифосфатазной активностью. NS3 способен связываться с РНК, отдавая предпочтение двунитевым структурам. При репликации вируса NS3 белок связывается с поли-U последовательностью на 3'-конце вирусного генома своим РНК-связывающим доменом и затем происходит раскручивание двунитевой РНК, свернутой в шпильки и другие пространственные структуры. Одновременно идет гидролиз нуклеотидтрифосфатов, осуществляемый другим доменом NS3. В третьих, NS3 белок способен специфически взаимодействовать с каталитической субъединицей клеточной протеинкиназы А, участвующей в передаче клеточных сигналов. Длительное присутствие NS3 протеина в клетке может привести к злокачественной трансформации гепатоцитов и развитию гепатоклеточной карциномы.

NS4 регион полипротеина состоит из двух белков – NS4A и NS4B. Первый имеет молекулярную массу 8 кДа и при такой небольшой массе обладает несколькими функциями. NS4A протеин является кофактором для NS3 протеазы, образуя с NS3 белком единый комплекс. Существование такого стабильного гетеродимерного комплекса, поддерживаемого атомом цинка, подтверждено кристаллографически. NS4A белок выполняет также функцию кофактора, необходимого для гиперфосфорилирования NS5A протеина, и функцию якоря, удерживающего на мембране ядра клетки репликативный комплекс HCV. Функция NS4B протеина остается неясной, однако предполагается, что он также принимает участие в формировании репликативного комплекса.

NS5 регион полипротеина построен из двух больших белков – NS5A (56 кДа) и NS5B (65 кДа). Белки освобождаются из полипротеина с помощью NS3-NS4A протеазного комплекса. NS5A аутокаталитически фосфорилируется по остаткам серина. Гиперфосфорилирование идет при участии NS4A протеина. Биологическая функция

фосфорилирования не ясна. NS5A белок высококонсервативен и обнаруживается на ядерной периплазматической мембране инфицированных клеток, где совместно с NS5B образует мембрано-связанный репликативный комплекс.

NS5A протеин играет важную роль в формировании механизмов устойчивости клеток к действию интерферона. NS5A протеин взаимодействует с протеинкиназой PRK, активность которой индуцируется интерфероном, Результатом взаимодействия является ингибирование молекулярных механизмов ответа инфицированных клеток на интерферон.

NS5B протеин является РНК-зависимой РНК-полимеразой. Он высоко консервативен и является функционально наиболее важным компонентом репликативного ядерного комплекса, который обеспечивает репликацию/транскрипцию вирусной РНК. На позитивной нити геномной РНК транскрибируется минус-нить, которая является матрицей для синтеза (+)РНК. Затем происходит формирование комплекса РНК с core-белком и его последующая транспортировка в эндоплазматический ретикулум, где с core-белком взаимодействуют поверхностные белки E1 и E2, достраивающие вирусную частицу.

Репликация вируса в восприимчивой клетке приводит заболеванию. Клинически HCV-инфекция протекает в форме гепатита легкой и средней тяжести с высокой степенью хронизации. На одного больного гепатитом С в разных регионах мира регистрируется от 5 до 30 хронически инфицированных лиц, у которых заболевание протекает в скрытой форме. Через 15-25 лет после инфицирования в 20-40 % случаев хронический гепатит С приводит к формированию цирроза печени и гепатоклеточной карциномы. Вирус гепатита С получил образное название «ласковый убийца», поскольку медленно и скрыто приводит к деструкции гепатоцитов или их злокачественной трансформации.

Наиболее эффективным способом лечения гепатита С является терапия интерфероном-альфа. Однако освобождение организма от вируса происходит лишь в 10-30 % случаев и зависит от генотипа вируса и хозяина. Наиболее нечувствительны к терапии интерфероном лица, инфицированные HCV генотипа 1b.

Генотерапия данного заболевания является одним из направлений лечения, на успехи которого надеются миллионы людей.

Генотерапия HCV-инфекции направлена на блокирование трансляции вирусного генома с использованием антисмысловых олигонуклеотидов. Создана библиотека олигонуклеотидов, обладающих такими свойствами. Это химически модифицированные олигонуклеотиды направлены к различным областям IRES вируса и белок-кодирующим

областям. Идентифицировано по крайней мере две антисмысловых последовательности, эффективно запрещающих выражение генов HCV. Установлено, что механизм действия нуклеотидов затрагивает ингибирование трансляции генома HCV и не зависит от активации эндогенной РНК-азы H на репликативную днРНК форму.

Суммированные результаты, полученные в мышинной модели с использованием рекомбинантного вируса вакцинии, содержащего фрагменты генома HCV, сплавленного с геном люциферазы светлячка, свидетельствуют, что антисмысловые олигонуклеотиды к области генома, кодирующей коровый белок, включая AUG, обеспечивают мощный механизм анти-HCV терапии, основанной на целевом запрещении трансляции вирусной mRNA.

Другой геномной целью в стратегии использования антисмысловых олигонуклеотидов является область 3'-НТР. Эта область генома HCV является высоко сохраненной у всех изолятов вируса и играет важную роль в транскрипции и репликации генома. Блокирование этой области генома антисмысловым олигонуклеотидом может запрещать транскрипцию.

Кроме стратегии использования антисмысловых олигонуклеотидов, проводится изучение возможности анти-HCV терапии с использованием рибозимов, которые являются ферментативными молекулами РНК, катализирующими расщепление РНК, и могут быть сконструированы к целевым определенным последовательностям РНК. Показано, что рибозимы могут быть эффективными в блокировании трансляции на уровне IRES HCV. Преимущество рибозимов заключается в том, что они могут быть эффективно пакетированы и выражены в различных вирусных векторах, включая вирус вакцинии, адено-ассоциированный вирус, различные ретровирусы. Кроме того, рибозимы эффективны в катализе как (+), так и (-) нитей РНК, что устраняет возникновение новых вариантов вируса и позволяет избежать появления лекарственно устойчивых форм вируса.

Главной проблемой при HCV инфекции является вирусное сопротивление терапии, основанной на интерфероне (IFN). Именно это свойство вируса определяет высокую степень сохранения вируса в пределах HCV-инфицированного населения. Сопротивление HCV IFN частично приписывают вирусной репрессии IFN-индуцируемого белка – киназы PKR. В связи с этим, NS5A-PKR взаимодействие может быть полезной терапевтической целью у лиц, которые не в состоянии отвечать на терапию IFN.

Разрушение NS5A-PKR взаимодействия может восстановить фосфорилирование eIF2a и прервать трансляционную блокаду, снижающую антивирусную активность IFN. Кроме

того, предполагается, что восстановление PKR-зависимого фосфорилирования eIF2a может быть полезным в сокращении сферы действия клеточных пролиферативных беспорядков, связанных с постоянной HCV инфекцией, т.к. NS5A репрессия PKR может обеспечивать онкогенный потенциал HCV.

3.4. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Гипертония. Системная гипертония это комплексное патофизиологическое состояние, которое характеризуется хроническим повышенным кровяным давлением. Гипертония может стать причиной ишемической болезни сердца, периферических сосудистых заболеваний, нарушений в области почек. Ключевую роль в большинстве случаев гипертонии играет ренин-ангиотензиновая система.

Группа корейских ученых использовали в качестве моделей взрослых крыс с повреждениями различных компонентов ренин-ангиотензиновой системы: натрийуретического пептида, калликреина, адреномедуллина и других. Доставка этих генов осуществлялась или в виде «голой» ДНК, или в составе вирусных векторов. У всех крыс повышалось содержание компонентов, гены которых им были введены. Это сопровождалось нормализацией давления крови, которое сохранялось до 3 месяцев.

Другими исследователями в качестве гентерапевтического подхода использовались антисмысловые олигонуклеотиды, направленные против мРНК ангиотензиногена или ангиотензинового рецептора. Использование антисмысловых нуклеотидов приводило к понижению давления в течение 2 месяцев.

Атеросклероз и другие сердечно-сосудистые заболевания. Атеросклероз является наиболее распространенным среди других сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с образованием атеросклеротических бляшек нарушается артериальное кровоснабжение, что может стать причиной развития многих других заболеваний. Для создания новых методов профилактики и лечения атеросклероза в клетки вводят гены, ответственные за синтез липопротеидов высокой плотности, которые необходимы для нормального процесса обмена жировых компонентов крови.

Основные способы хирургического вмешательства при лечении атеросклероза предполагают использование ангиопластики. Однако, ее применение ограничивается часто развивающейся гиперплазией сосудов.

Первые сообщения об успешной генной трансфекции сосудистых клеток появились еще в начале 90-х годов. В этих исследованиях *ex vivo*, проводимых на сингенных

поросятах, использовали трансфицированные эндотелиальные клетки с геном β -галактозидазы, обладающей цитотоксическими свойствами. Для генной терапии сосудистой гиперплазии использовали *ex vivo* модификацию клеток генами, кодирующими цитотоксические продукты: цитозиндеаминаза, тимидинкиназа вируса простого герпеса.

Другими объектами генотерапевтических манипуляций были различные регуляторы клеточного цикла (циклины, циклинзависимые киназы и их ингибиторы), клеточные медиаторы серин/треониновые киназы, факторы транскрипции, цитокины, факторы роста, Fas лиганд. Проблему повышения тромбообразования пытаются решать с помощью генетической модификации эндотелия кровеносных сосудов, например, путем введения генетической конструкции, содержащей ген активатора плазминогена.

Важным направлением исследований является также восстановление сосудистой системы сердечной мышцы после инфаркта путем введения генов, которые индуцируют процесс сосудообразования (ангиогенез).

Нарушение эрекции. По данным 1995 года в мире более ста миллионов мужчин страдает нарушениями эрекции. Чаще всего нарушения эрекции связаны с повреждением сосудов пениса. В связи с этим разрабатываемые подходы генной терапии во многом основываются на опыте, полученном при создании молекулярно-генетических методов лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Нормальная эрекция обеспечивается сбалансированным действием расслабляющих и сжимающих механизмов гладкой мускулатуры пениса. Основными генами, продукты которых участвуют в обеспечении нормальной эрекции пениса, являются гены ферментов и вторичных мессенджеров, способствующих расслаблению гладкомышечных клеток. Разработано несколько вариантов векторов вирусной и невирусной природы, несущих ген фермента эндотелиальной нитритоксидсинтазы. Эксперименты на крысах показали длительное восстановление способности гладкой мускулатуры пениса повышать давление крови в пещеристом теле.

Другая группа ученых в качестве терапевтического гена использовали ген hSlo, кодирующий продукт, усиливающий проводимость кальций-чувствительных калиевых каналов и способствующий активации адгезионных контактов между миоцитами сосудов пещеристого тела.

Отек легких. Это заболевание связано с накоплением жидкости в легких. Эндотелиальные клетки капилляров легких за счет плотных адгезионных контактов

создают барьер, делая практически невозможным прохождение даже небольших молекул через этот слой. Многочисленные исследования показали, что отек легких напрямую связан с повреждением капиллярного легочного барьера. Выявлены потенциальные факторы, способные вызвать отек легких. Это могут быть активные формы кислорода, цитокины, бактериальные продукты.

Эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) рассматривают как один из факторов, стимулирующих проходимость клеточного барьера, в частности при отеке легких, вызванном повышенным содержанием тромбина. Тромбин способствует повышению экспрессии рецепторов VEGF на мембране эндотелиоцитов. Предполагается, что повышенное содержание данного фактора роста приводит к повреждениям основных белков, входящих в состав плотных контактов – окклюдина и клаудина.

В попытках генной терапии отека легких использовали генетические конструкции на основе аденовирусного вектора, несущего усеченный ген *flt-1*. Этот ген кодирует растворимую форму предшественника рецептора VEGF. При стабильной экспрессии этого гена клетками эндотелия растворимый рецептор, связываясь с VEGF, препятствует его взаимодействию с мембранными рецепторами.

4. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Всего 20 лет назад самыми тонкими методами изучения наследственной патологии человека были цитогенетический анализ дифференциально окрашенных хромосом и биохимическое исследование метаболитов и ферментов методами электрофореза и хроматографии. Со второй половины 80-х годов ситуация радикально изменилась. Новые методы выделения, клонирования, секвенирования, гибридизации ДНК уже вошли в лабораторную и клиническую практику диагностики наследственной патологии. Многообразие форм наследственных болезней (а их уже известно более 4 тыс.), изменчивость их клинических проявлений и часто отсутствие радикального лечения делают особенно актуальной разработку точных ранних (преклинических и пренатальных) методов диагностики этих болезней. А это, прежде всего, ДНК-диагностика, молекулярная цитогенетика, тонкая биохимическая и иммунодиагностика, компьютерный информационный анализ. В настоящем изложении мы остановимся на двух из них – методе полимеразной цепной реакции, которая является составной частью методологии обнаружения и идентификации генных патологий, и информационных технологиях, позволяющих проводить долабораторную диагностику заболеваний.

4.1. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Революционным моментом в развитии генодиагностики различных заболеваний, в том числе и генетически обусловленных, явилась разработка метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая позволяет производить за считанные часы получать до 100 млрд. сходных по структуре молекул ДНК, даже если исходной была всего одна молекула. Позднее было показано, что субстратом реакции (мишенью) в ПЦР могут служить как ДНК, так и РНК, полученная в форме комплементарной ДНК, что значительно расширило возможности получения необходимых нуклеотидных последовательностей.

Для того чтобы этот метод состоялся, должны были быть сделаны следующие открытия:

1. Открытие двойной спирали ДНК. За установление структуры молекулы ДНК (1953 г.) Д. Уотсон, Ф. Крик, М. Уилкинс были удостоены Нобелевской премии 1962 года.
2. Открытие А. Корнбергом с коллегами (1955 г.) ДНК-полимеразы – фермента, способного удлинять короткие олигонуклеотидные затравки. За открытие механизма

биосинтеза ДНК и РНК и открытие ДНК-полимеразы присуждена Нобелевская премия 1969 года.

3. Открытие явления денатурации-ренатурации молекулы ДНК, другими словами плавления – комплементарного спаривания оснований, которое было сделано Мармур и Доти в 1961 г.

4. Обнаружение термостабильных ДНК-полимераз - ферментов, осуществляющих синтез ДНК при высоких температурах (температурный оптимум составляет 72 °С).

5. Открытие Д. Балтимором, Х. Темингом и Мизутани (1970 г.) фермента обратной транскриптазы, осуществляющего синтез ДНК на матрице РНК.

6. Генерация в 1983 г. К. Мюллисом идеи использования вместо случайных затравок для ДНК-полимеразы двух специфических синтетических олигонуклеотидов (праймеров) и многократного повторения процедуры синтеза. Впервые идея о полимеразной цепной реакции была реализована в 1985 г. на фирме Cetus (США). В 1993 г. К. Мюллис был удостоен Нобелевской премии.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод амплификации ДНК в условиях *in vitro*. Термином амплификация обозначают процесс многократно повторяющихся актов синтеза определенных последовательностей ДНК с использованием термостабильных ДНК-полимераз (Tag-pol, Tfh-pol, Pwu-pol) и специфичных в отношении искомого генома олигонуклеотидных последовательностей размером 17-30 нуклеотидных остатков (н.о.), называемых праймерами (Рис. 21). Праймеры конструируют путем сравнения ряда геномных последовательностей и выбора наиболее консервативных участков, специфичных в отношении данного генома. Для амплификации искомого фрагмента ДНК подбирают пару праймеров, ограничивающих (фланкирующих) нужный участок нуклеотидной последовательности.

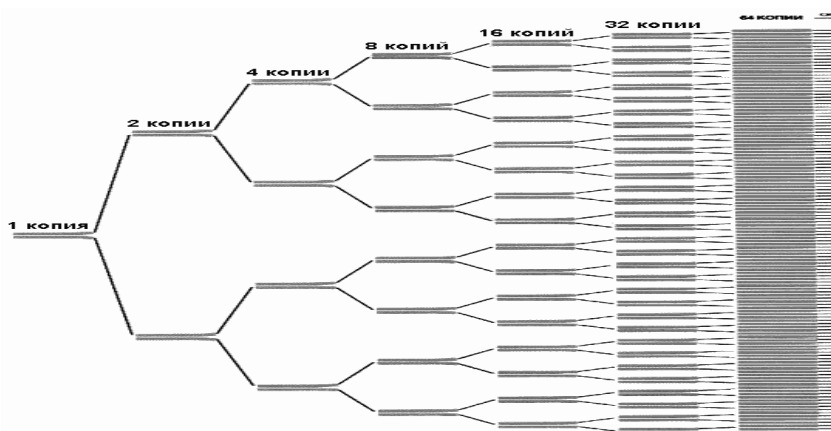


Рис. 21. Полимеразная цепная реакция – метод амплификации ДНК в условиях *in vitro*
В процессе ПЦР происходит экспоненциальное увеличение числа копий ДНК.

Для того, чтобы провести наработку нужной последовательности, используя в качестве матрицы мРНК, необходимо получить ее ДНК-копию. Для этих целей используют реакцию обратной транскрипции (ОТ), осуществляемую РНК-зависимой ДНК-полимеразой, называемой также ревертазой или обратной транскриптазой. В настоящее время для этих целей используют три ревертазы: AMV из вируса миелобластома птиц, М-MuLV из вируса лейкемии мышей и термостабильную ДНК-полимеразу Tth, обладающую ревертазой активностью, из термофильных бактерий. Используя в качестве затравок или специфические праймеры или случайные последовательности (статистические затравки), ревертаза, согласно принципу комплементарности нуклеотидных оснований, синтезирует ДНК на матрице РНК. В результате получается комплементарная ДНК (кДНК), которую используют на следующем этапе анализа - амплификации фрагмента ДНК с использованием ПЦР.

Процесс амплификации ДНК заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК (93-95 °С), отжига (гибридизации) праймеров (50-65 °С) и удлинения цепи (72 °С) - достройки праймеров ДНК-полимеразой на матрице ДНК согласно принципу комплементарности нуклеотидных оснований. В течение 30-40 циклов происходит экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК по формуле 2^n (n - число прошедших циклов амплификации), т.е. в 10^8 раз, по сравнению с исходным.

В первом цикле происходит следующее: сначала ДНК расплетается на две цепочки при температуре 93-95⁰С градусов в течение 30-40 секунд. Затем температура специально снижается до 50-65⁰С градусов. При такой температуре нити ДНК ещё не могут заплестись обратно, а вот праймеры-образцы могут к ним присоединиться (Рис. 22).

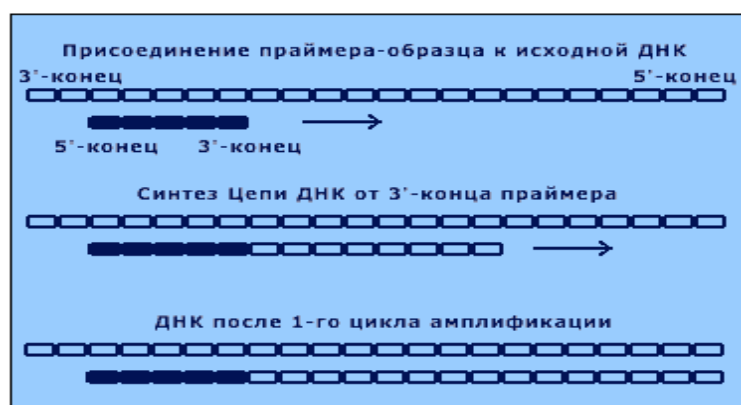


Рис. 22. Молекулярные события в первом цикле ПЦР.

Присоединяться нуклеотиды могут только к 3'-концу цепочки, поэтому новая цепь ДНК будет не копией исходной, а обрезанной с одной стороны в том месте, где к исходной присоединится праймер. Нуклеотиды присоединяются лучше всего при температуре в пробирке 72⁰С градуса (оптимум работы Таq-полимеразы) в течение 20-40 секунд.

К началу второго цикла амплификации в пробирке останутся неиспользованные праймеры-образцы, неразрушившаяся Таq-полимераза, свободные нуклеотиды и двойные молекулы ДНК, одна из цепочек которых больше другой (Рис. 23).

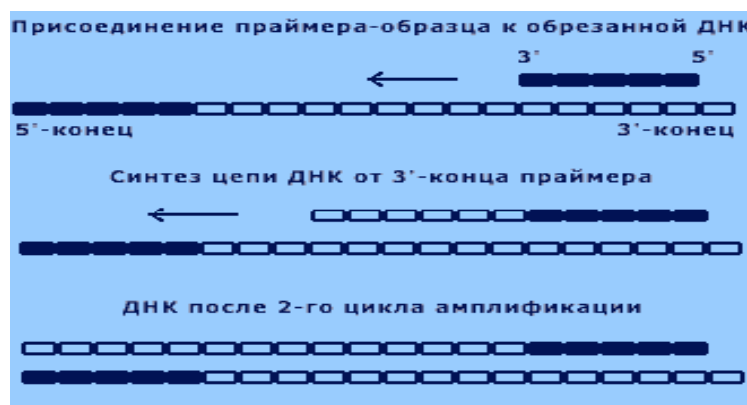


Рис. 23. Молекулярные события во втором раунде ПЦР.

Второй раунд снова начинается с денатурации ДНК. При этом образуются разные виды цепочек. Одни из них будут равноценны исходным. С ними будет происходить то же, что и на первом цикле амплификации. Второй вид цепочек - короткий. С одной стороны они ограничены первым праймером-образцом. Так как никаких РНК-затравок в растворе нет и к 3'-концу исходной короткой цепочки может присоединиться только 5'-конец второго праймера-образца, то он туда и присоединяется. А дальше к нему присоединяются свободные нуклеотиды и цепочка удлиняется до тех пор, пока матричная ДНК не кончится.

К началу третьего цикла амплификации в растворе продолжают оставаться неиспользованные праймеры-образцы, неразрушившаяся Таq-полимераза, свободные нуклеотиды и двойные молекулы ДНК. Теперь существует два вида молекул ДНК: 1-ый вид - тот же самый, что и по завершению 1-го цикла амплификации - одна цепочка - исходная, другая - обрезанная с одной стороны; 2-ой вид - одна цепочка - обрезанная с одной стороны, вторая - обрезанная с двух сторон. Именно она нам и нужна. Эта цепочка называется ампликоном и является целью ПЦР. Длина ампликона обычно составляет несколько сот нуклеотидов. В последующих циклах амплификации будут также

синтезироваться два вида неполных ДНК и много полных ДНК, в которых обе цепочки равны друг другу по длине и ограничены с обеих сторон праймерами-образцами. "Обрезания" не происходит потому, что праймеры присоединяются к самым концам цепочек.

Количество ампликонов растёт в растворе экспоненциально, то есть по формуле 2^n , где n - количество циклов амплификации. Так как на один цикл амплификации затрачивается от 1 минуты 10 секунд до 2 минут 20 секунд, то из одной молекулы ДНК через час после начала синтеза будет образовано от 55 миллионов ампликонов до $3 \cdot 10^{15}$. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции полученного фрагмента методом электрофореза в агарозном геле.

ПЦР обычно проводят в автоматическом режиме, используя для этого специальные приборы – термоциклеры или амплификаторы ДНК. Такой прибор позволяет задавать нужное количество циклов и выбирать оптимальные временные и температурные параметры для каждой процедуры цикла из большой и часто непрерывной шкалы возможных вариантов.

В техническом исполнении ПЦР очень проста. Все компоненты реакции – матричную ДНК, праймеры, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) и термофильную ДНК-полимеразу – добавляют в специфический буфер (часто одномоментно), наслаивают небольшой объем вазелинового масла для предотвращения высыхания реакционной смеси, затем пробирку в автоматический термоциклер и выбирают необходимую программу циклической смены температуры и длительности каждого шага реакции. Общий объем реакционной смеси обычно составляет от 10 до 100 мкл. Выбор оптимального режима работы определяется длиной и специфичностью амплифицируемого участка.

С помощью ПЦР можно непосредственно исследовать места предполагаемых мутаций или полиморфных сайтов, а также изучать наличие любых других специфических особенностей ДНК. В качестве источника матричной ДНК может быть использован любой, даже деструктурированный биологический материал, сохранивший в своем составе достаточно полный набор фрагментов исходных молекул ДНК. Для специфической амплификации наряду с очищенной ДНК используют высушенные на фильтровальной бумаге пятна крови, небольшие кусочки тканей, смывы с полости рта и смывы с других слизистых поверхностей и т.д.

Существуют различные модификации ПЦР, применение которых зависит от конкретных целей проведения реакции или от характера последующего молекулярного

анализа амплификатов. Так, для трудно амплифицируемых участков ДНК, содержащих различные повторяющиеся последовательности или необычные структурные элементы, а также в тех случаях, когда матричная ДНК присутствует в следовых количествах, ПЦР проводят в два этапа, используя в качестве матричной ДНК на втором этапе амплификации продукты ПЦР, синтезированные на первом этапе.

Двухраундовая ПЦР может быть реализована в двух вариантах – «гнездовом» или «nested» варианте, когда во втором раунде используют дополнительную внутреннюю пару праймеров, и в «полугнездовом» или «semynested» варианте, когда используют дополнительно один внутренний праймер (Рис. 24). Следует отметить, что применение двухраундовой ПЦР повышает чувствительность и специфичность метода, однако «гнездовые» праймеры не очень пригодны для рутинных процедур, поскольку манипуляции с ПЦР-амплифицированной ДНК перед второй амплификацией повышают вероятность ее загрязнения.

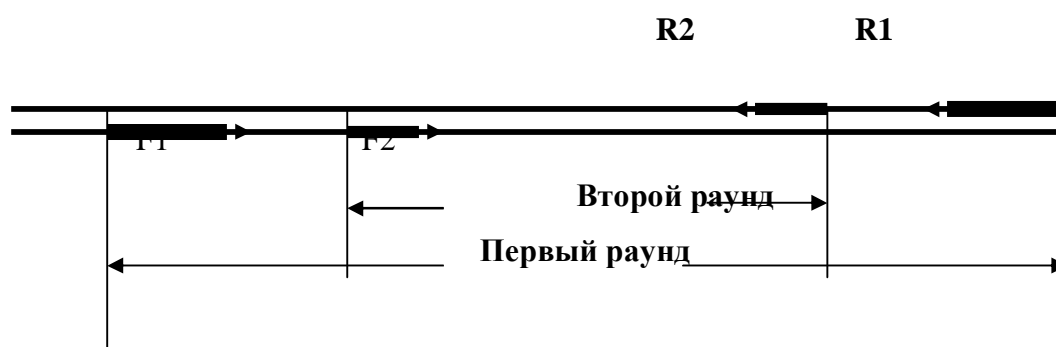


Рис. 24. Схема отжига праймеров при реализации различных вариантов ПЦР.

Однораундовая ПЦР: F1-R1 – прямой вариант;

Двухраундовая ПЦР: первый раунд – F1-R1, второй раунд- F2-R2 («гнездовой» вариант) и F1-R2 или F2-R1, альтернативно («полугнездовой» вариант).

В ряде случаев удобно проводить мультиплексную ПЦР, то есть одновременную амплификацию нескольких участков матричной ДНК.

Благодаря постоянному совершенствованию метода (особый подбор праймеров, использование сразу двух различных ДНК-полимераз, трицинового бцфера, специального температурного режима полимеразных циклов и др.) возможно проведение амплификации фрагментов ДНК, достигающих 35 тыс. пар оснований.

Возможность очень точного и специфического выбора участка ДНК для амплификации, небольшие размеры синтезируемых молекул, их огромное количество

чрезвычайно облегчают молекулярный анализ продуктов ПЦР. Как правило, амплифицированную ДНК можно непосредственно наблюдать в проходящем ультрафиолетовом свете в виде красной полосы после электрофоретического концентрирования и обычного окрашивания бромидом этидия. При наличии сайтов рестрикции в амплифицированных участках ДНК после их обработки эндонуклеазами и электрофореза количество и положение окрашенных полос на геле изменяется в соответствии с положением этих сайтов. С помощью электрофореза могут быть выявлены небольшие отклонения в размерах синтезированных молекул, которые возникают за счет делеций или инсерций нескольких нуклеотидов в исходной матричной молекуле ДНК.

Наконец возможно определение полной нуклеотидной последовательности синтезированной молекулы с идентификацией всех мутаций в исследуемом районе матричной ДНК. Разработаны варианты ПЦР, при которых синтезируются преимущественно одностранные фрагменты ДНК, что в последующем значительно облегчает их секвенирование. Таким образом, метод ПЦР стал одним из основных в молекулярной диагностике различных заболеваний, в том числе и идентификации генетически обусловленных заболеваний.

Разработаны и широко используются в практике различные варианты метода, позволяющие быстро и эффективно идентифицировать мутации, изучать ДНК-полиморфизмы, применяемые для молекулярного маркирования мутантных хромосом.

4.2. ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Накопление знаний о множестве синдромов генных патологий и их молекулярных причинах послужили основанием для разработки новых информационных технологий долабораторной диагностики наследственных и других генных заболеваний. В последние годы в России наметился прогресс в создании специализированных компьютерных информационно-поисковых систем по цитогенетическому картированию и порокам развития человека.

Медицинская направленность компьютерных диагностических систем определяется поставленными задачами и уровнем применения: 1) предварительная диагностика на долабораторном этапе обследования с построением дифференциального ряда; 2) диагностика с выбором оптимального метода исследования для последующей окончательной нозологической идентификации патологии; 3) нозологическая диагностика с постановкой (обоснованием) конкретного диагноза на основе имеющейся информации (клинической и параклинической); 4) ориентировочная диагностика с оценкой тяжести

состояния как основа для принятия решения (управления уровнем помощи) при угрожающих состояниях.

В Медико-генетическом научном центре РАМН разработаны две компьютерные информационно-поисковые системы (ИПС): "SYNGEN" и "CHRODYS". Эти системы ориентированы на первичную диагностику, уточнение показаний к кариотипическому исследованию и фундаментальное изучение морфогенеза человека.

Система "SYNGEN", включающая 1920 синдромов врожденных пороков развития, значительно ускоряет постановку объективного диагноза. Оперируя почти двумя тысячами синдромов и словарем, обозначающим полторы тысячи признаков, с помощью этой компьютерной системы можно достаточно быстро составить список диагнозов-кандидатов по исходным клиническим характеристикам. Таким образом, информационно-поисковая система "SYNGEN" помогает выявить синдромальные формы заболеваний и может стать незаменимым средством в профилактике врожденных болезней. Хотя многие случаи врожденных пороков развития относятся к тем или иным синдромам, на практике без применения компьютерных систем половина из них остается неузнанной.

Система "CHRODYS", позволяет осуществлять анализ фено-кариотипических корреляций при хромосомном дисбалансе. В системе, в отличие от вышеприведенной, используются первичные описания, а не обобщенные образы заболеваний. Было показано, что, несмотря на общность фенотипических проявлений, аутосомные синдромы отличаются характерными ассоциациями признаков нарушений морфогенеза, что служит основой для распознавания множественных ВПР с помощью компьютерных систем. Новые компьютерные технологии позволяют врачам оперативно обмениваться медицинским опытом. Никакие издания не успевают за потоком новой информации. В этом ключе особое значение приобретают уникальные генетические банки данных. В системе "CHRODYS" собраны сведения более чем о 600 хромосомных синдромах точно установленных или заявленных как возможные формы по всем аутосомам (они представлены по каждому виду патологии несколькими или единичными случаями). Завершена работа по созданию компьютерного медико-цитогенетического банка, в котором содержатся сведения по 624 моно- и трисомиям аутосом, выявленным у 2351 пациента. Банк предназначен для цитогенетического картирования генома и уже применяется для диагностики хромосомных аномалий в медико-генетических консультациях России.

ИПС используется в практическом здравоохранении в ряде региональных медико-генетических консультаций и диагностических центров России, для обучения редким

синдромам, для поиска причин возникновения и путей развития хромосомных болезней, для прицельного молекулярного картирования и изучения генома. Что касается информационно-поисковых систем (ИПС), относящихся к принципиально другому классу программных средств, обеспечивающих накопление и поиск данных, то с течением времени они также начали включать аналитические блоки, что позволило перейти к индивидуально-групповому управлению процессом профилактики и лечения на основе использования накапливаемых в их базах данных сведений о диспансеризуемых контингентах населения. Это привело к появлению нового термина - информационно-вычислительные системы (ИВС).

Что касается выбора методологии для построения автоматизированной системы, то наибольший интерес в настоящее время представляет класс экспертных систем (ЭС), опирающихся на теорию искусственного интеллекта. Это объясняется тем, что такие системы включают базу специальных знаний в конкретной проблемной области и предоставляют возможность ознакомления с протоколом результатов распознавания медицинской ситуации и логического объяснения предлагаемого системой решения.

В Московском НИИ педиатрии и детской хирургии была создана широко известная система по наследственным болезням у детей "ДИАГЕН", ориентированная на выделение узкого дифференциально-диагностического ряда из 1200 моногенных и хромосомных заболеваний детского возраста на долабораторном этапе обследования детей, т. е. до проведения специальных дорогостоящих исследований, позволяющих окончательно уточнить диагноз. Она включает три подсистемы: диагностика, архив, справочник (клинические аспекты и библиография). Она также включает фотоархив, содержащий более 1000 изображений характерных фенотипических проявлений данных болезней и синдромов. В системе предусмотрена и работа в условиях неопределенных и неточных исходных данных, что особенно важно для клинической генетики, где, как было отмечено, имеет место значительная фенотипическая вариабельность заболеваний, а также возрастная зависимость клинических проявлений при метаболических болезнях накопления. Одновременно оценка значимости признака для распознавания заболевания предлагается врачу-пользователю системы, который может изменить "вес" любого из отмеченных у ребенка симптомов в соответствии с его гипотезой о их диагностической ценности в конкретном случае, что позволяет использовать опыт и интуицию врача-генетика, в какой-то степени осуществлять индивидуальную "настройку" компьютерной системы. По результатам работы системы врач получает перечень возможных диагнозов (дифференциальный ряд), упорядоченный по степени вероятности, и может просмотреть

описания, включающие клинико-генетическую информацию о заболеваниях (включая путь наследования и вид специального исследования), а также протокол вывода формирования полученной последовательности диагнозов.

Другим вариантом сочтанного комплекса информационно-вычислительной системы может служить Федеральный генетический регистр - многофункциональный комплекс, включающий семейную базу данных с графической родословной, на основе которой осуществляется расчет генетического риска в отношении моногенно обусловленных болезней (математические модели для этого реализованы сотрудниками Института клинической генетики Медицинского генетического центра РАМН). Эта система, разработанная в целом в Московском НИИ педиатрии и детской хирургии в рамках Федеральной программы "Дети России" (подпрограмма "Дети-инвалиды"), расширяется в настоящее время за счет подключения двух интеллектуальных систем поддержки врачебных решений - для выбора плана обследования детей и для анализа характера наследственной передачи мутантных генов в семьях.

В перспективе именно интеграция баз данных с экспертными системами позволит существенно расширить возможности врачей и повысить эффективность диагностических решений.

ЛИТЕРАТУРА

- Баранов В.С. Генная терапия – медицина XXI века // СОЖ. – 1999. – № 3. – С. 63-68.
- Генетика. Учебник для вузов/Под ред. акад. РАМН В.И. Иванова. – М., 2006. – 638 с.
- Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. – СПб, 1997. – 287 с.
- Гублер Е.В. Информатика в патологии, клинической медицине и педиатрии. - Л.; Медицина, Ленингр. отд. 1990;176.
- Кнорре Д.Г. Химические инструменты в современной биологии (на примере антисмысловых воздействий на генетические структуры) // СОЖ. – 1998. – № 12. – С. 25-31.
- Кобринский Б.А. Системы искусственного интеллекта в медицине: Состояние, проблемы и перспективы//Новости искусств. интеллекта 1995;2:65-79.
- Новиков П.В., Вельтищев Ю.Е. Роль наследственности в патологии детского возраста: методы диагностики, терапии, профилактики. – М., 2004. – 207 с.
- Фаворова О.О. Лечение генами – фантастика или реальность? // СОЖ. – 1997. – № 2. – С. 21-27.
- Чизмаджев Ю.А. Перенос нуклеиновых кислот в ткани и клетки (на пути к генной терапии) // СОЖ. – 2004. – Т. 8, № 2. – С. 24-29.
- Vantounas I., Phylactou L.A., Uney J.B. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems // J. Mol. Endocrinology. – 2004. – Vol. 33. – P. 545-557.
- Buchsacher G.L., Wong-Staal F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases // Blood. – 2000. – Vol. 95. – P. 2499-2504.
- Bunnell B.A., Morgan R.A. Gene therapy for infectious diseases // Clin. Micr. Rev. – 1998. – Vol. 1. – P. 42-56.
- Douar A.-M., Themis M., Coutelle C. Fetal somatic gene therapy // Mol. Hum. Reproduction. – 1996. – Vol. 2. – P. 633-641.
- Hu W.-S., Pathak V.K. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy // Pharmacol. Rev. – 2000. – Vol. 52. – P. 493-511.
- Jen K.-Y., Gewirtz A.M. Suppression of gene expression by targeted disruption of messenger RNA: available options and current strategies // Stem cells. – 2000. – Vol. 18. – P. 307-319.
- Leiden J.M. Human gene therapy: the good, the bad, and the ugly // Circ. Res. – 2000. – Vol. 86. – P. 923-925.

- Lever A.M.L. Gene therapy for HIV // *Sex. Transm. Inf.* – 2001. – Vol. 77. – P. 93-96.
- Liang L., Liu D.-P., Liang C.-C. Optimizing the delivery systems of chimeric RNA-DNA oligonucleotides // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – Vol. 269. P. 5753-5758.
- Lim M.S., Elenitoba-Johnson K.S.J. The molecular pathology of primary immunodeficiencies // *JMD.* – 2004. – Vol. 6. – P. 59-83.
- Milhavet O., Gary D.S., Mattson M.P. RNA interference in biology and medicine // *Pharmacol. Rev.* – 2003. – Vol. 55. – P. 629-648.
- Miller N., Vile R. Targeted vectors for gene therapy // *FASEB.* – 1995. – Vol. 9. – P. 190-199.
- Relph K., Harrington K., Pandha H. Recent developments and current status of gene therapy using viral vectors in UK // *BMJ.* – 2004. – Vol. 329. – P. 839-842.
- Richardson P.D., Augustin L.B., Kren B.T., Steer C.J. Gene repair and transposon-mediated gene therapy // *Stem cells.* – 2002. – Vol. 20. – P. 105-118.
- Seidman M.M., Glazer P.M. The potential for gene repair via triple helix formation // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 112. – P. 487-494.
- Selkirk S.M. Gene therapy in clinical medicine // *Postgrad. Med. J.* – 2004. – Vol. 80. – P. 560-570.
- Sullenger B.A. Targeted genetic repair: an emerging approach to genetic therapy // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 112. – P. 310-311.
- Young L.S., Mautner V. The promise and potential hazards of adenovirus gene therapy // *Gut.* – 2001. – Vol. 48. – P. 733-736.