

ГЕНЕТИЧНО И ГЕННО ИНЖЕНЕРСТВО

**Доц. Милена Атанасова, д.б.
Ръководител сектор “Биология”
МУ-Плевен**



ТЕРМИНОЛОГИЯ

Генетично инженерство:

Изменението на наследствени признаци на организъм или отделни клетки в желана от човека посока

Генно инженерство: Манипулации с фрагменти от ДНК молекула или отделни гени



- ★ “**инженерство**”, термин, който отразява големите възможности на науката да манипулира фундаменталните единици на наследствеността – да променя и пренарежда нуклеотидите в гени и да ги въвежда в различни организми
- ★ По прецизен термин за тези процеси е **Рекомбинантни ДНК - технологии**



Нива на генетичното инженерство

- ★ Популационно
- ★ Организмово
- ★ Клетъчно
- ★ Молекулно (ДНК, РНК, рекомбинантни технологии)



Генетичното инженерство на популационно ниво

- ★ Несъзнателен отбор и селекция от древността – сортове растения и породи животни
- ★ Евгеника – методи за селектиране на човешката популация:
 - позитивна – поощряване на размножаването при някои раси (арийската раса)
 - негативна – ограничаване на раждаемостта, препоръчан селективен аборт



Генетичното инженерство на организмово ниво

- * Селекция на полови клетки (предзиготна селекция)
 - Сперматозоиди при *in vitro* оплождане
 - Аспирация и анализ на полярни телца от зрели яйца
 - Селекция на ниво зигота - при *in vitro* оплождане
 - Следзиготна селекция – планирано прекъсване на бременността (терапевтичен аборт):

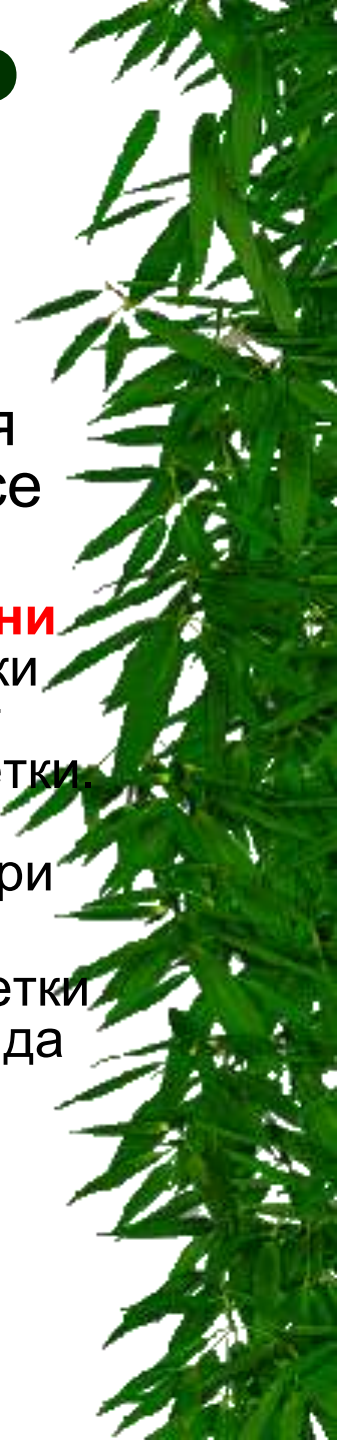
При опасност за майката

В резултат на пренатална диагностика (амниосцентеза, хориална биопсия)



Генетичното инженерство на **клетъчно** ниво

- ★ Според времето, за което една клетъчна линия може да бъде отглеждана в лабораторен съд се различават:
 - **първични клетъчни култури; Експланти и клетъчни култури** - част от растителните и животинските клетки могат да живеят, да се размножават и дори изявяват някои свойства, характерни за диференцираните клетки. Напр. фибробластите, продължават да секретират колаген, нервните клетки образуват аксони, които дори установяват синапси с други нервни клетки.
 - **вторични клетъчни култури (клетъчна линия)**; клетки от човешката кожа се делят от 50 до 100 пъти преди да загинат. В резултат на генетични или други промени потомци на клетки, отгледани в култура, могат да се окажат безсмъртни и се наричат **клетъчни линии**
 - **трайна (непрекъсната)** клетъчна линия.



Образуване на хибридни клетки

- ✱ Нормални клетъчни линии могат да се трансформират чрез тумор, индуциращи вируси (инактивиран вирус на Сендай) или различни химикали (полиетиленгликол)
трансформирани клетъчни линии - клетки от такива линии могат да предизвикват тумори, когато се инжектират на опитни животни
- ✱ **хетерокарион** - сливане на една клетка с друга и като резултат се получава комбинирана клетка с две отделни ядра
- ✱ **хибридна клетка** - двете отделни ядрени обвивки да се слеят в една обща, така че всичките хромозоми да се обединят заедно в едно голямо ядро.



Хибридоми

- ★ приложение за производство на моноклонални (високоспецифични) антитела
- ★ резултат от сливането на туморни (миеломни) клетки, осигуряващи неспирно делене, и В-лимфоцити, гарантиращи високата специфичност в производството на антитела от конструираната „обезсмъртена“ клетка
- ★ култивират се „in vitro“ или „in vivo“ в перитонеалната кухина на опитно животно, като при това произвеждат значителни количества моноклонални антитела
- ★ **моноклонални антитела** – прилагат се в медицинската диагностика и за евентуално лечение на проблемни за медицината заболявания. (напр. тумори)



Генетично инженерство на **субклетъчно** ниво

- ★ **Реконструкция на клетки** съединяване на ядра и цитоплазма от различни източници за изучаване функцията на ядро в „чужда“ цитоплазма и обратното
- ★ **Пренасяне на отделни хромозоми** - това явление може да се наблюдава по-често, ако „чуждата“ хромозома се включи предварително в липозома. Отделни нейни фрагменти могат да се интегрират на подходящи места в хромозомния набор и да експресират някои от носените гени.



Приложение

- ★ **Получаване на трансгенни животни** - микроинжектиране на молекули ДНК (копия от гени) в пронуклеус на зигота (най-често от гризачи)
- ★ **Клониране** чрез трансплантация на ядра от **соматични клетки в овоцити** - „ядрената еквивалентност“ на различни клетки от възрастен организъм и на гаметите, и доказва, че соматичното ядро съдържа пълния генетичен набор, необходим за развитие на жизнени потомци



★ Dolly

- Клон взет от вимето на майка и
- Неоплодено яйце, чието ядро е премахнато е слято с клетка от вимето
- Слятата клетка е стимулирана да се дели и имплантирана в майка-заместител



★ Polly

- В диплоидна клетка от възрастна овца е въведен гена за човешки кръвосъсирващ фактор и клетката е слята с енуклеирана яйцеклетка
- Слятата клетка е стимулирана да се дели и имплантирана в майка-заместител.
- Полученото агънце има човешки ген във всяка клетка от тялото си

Клониране

- ★ **клонинг** - малко вероятно да се получи абсолютно точно копие на висш организъм, поради влиянието на естествения радиоактивен фон върху НК и поради изменилите се в различна степен външни условия
- ★ **терапевтично клониране** с цел получаване на клетки и органи (вече е постигната „*in-vitro*“ органогенеза на млечна жлеза и ухо) за лечение чрез трансплантация



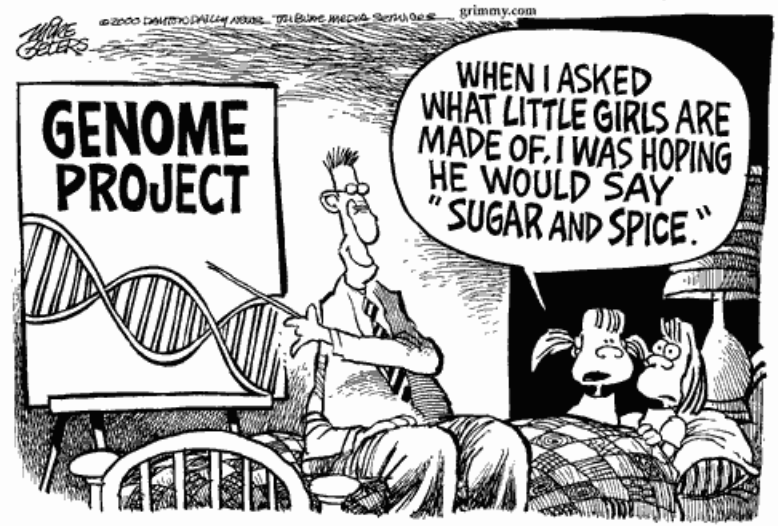
- ★ **Стволови клетки** - използването на недиференцирани ембрионални (стволови) клетки, които да се манипулират в култура, и по-късно, инжектирани в тялото на болен човек, да подменят увредените клетки (напр. при диабет, Алцхаймер, някои форми на злокачествени тумори и др.)
- ★ клониране на селскостопански животни би спомогнало за много бързото разпространение на рядко срещани (или създадени) мутанти с ценни свойства
- ★ при значителна част от родените животни се наблюдават **дефекти** в различни системи и органи



Рекомбинантни ДНК технологии



© Original Artist
Reproduction rights obtainable from
www.CartoonStock.com



"WHAT DID YOU LEARN IN SCIENCE CLASS, TODAY?"

- ★ Рекомбинантните ДНК техники водят началото си от Stanley Norman Cohen и Herbert Boyer, които през 1973 г. публикуват статията “Конструиране на биологично функционален бактериален плазмид *in vitro*”, която описва техника за изолиране и амплифициране на гени или ДНК сегменти и въвеждането им в други клетки – създават **трансгенни бактерии**.

- ★ Stanley N. Cohen, Annie C. Y. Chang, Herbert W. Boyer, and Robert B. Helling **Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 Nov;70(11):3240-4.**

- ★ Терминът **Рекомбинантна ДНК** молекула се отнася за комбинация от ДНК молекули, която не съществува естествено в природата.
- ★ За да се разграничи от **кросинговъра** (генетична рекомбинация) рекомбинантната ДНК се отнася за резултата от изкуствено съединени молекули, произхождащи от различни биологични видове.



ЕСТЕСТВЕННИ МЕХАНИЗМИ НА РЕКОМБИНАЦИЯ НА ДНК

- ★ **Трансформация:** генетична промяна вследствие на внасяне, инкорпориране и експресирание на чужда ДНК
- ★ **Трансдукция:** пренос на вирусна и/или бактериална ДНК чрез бактериофаги
- ★ **Трансфекция:** внасяне на НК чрез невирусни методи



ЕТАПИ НА РЕКОМБИНАНТНИТЕ ТЕХНОЛОГИИ:

- I. **Изолиране на гена**, който ни интересува.
Изолирания ген (инсерт) се въвежда в така наречения вектор.
- ★ **Вектори** са молекули ДНК, способни самостоятелно да се самовъзпроизвеждат (**бактериални плазмиди или вирусни фаги**).
- ★ ДНК-молекулите се накъсват на малки фрагменти с ензими, наречени **рестрикционни ендонуклеази (рестриктази)**.



ЕТАПИ НА РЕКОМБИНАНТНИТЕ ТЕХНОЛОГИИ:

- ★ Подходящ плазмид и генът се третира с **една и съща рестриктаза**, след което „лепливите“ краища се „съшиват“ трайно с ензима лигаза. Така получаваме вектор (рекомбинантен плазмид), съдържащ инсерт (присадка) с желана от нас ДНК последователност
- ★ Комбинацията от желания ген и плазмид или фага се означават като **рекомбинантна ДНК**.



ЕТАПИ НА РЕКОМБИНАНТНИТЕ ТЕХНОЛОГИИ:

II. Включване на рекомбинантната ДНК в подходяща клетка реципиент

– Трансдукция или трансфекция

III. Всяка клетка с рекомбинантна ДНК = **КЛОН**

След това се извършва селекция и клетките, които съдържат желаният ген, т. е. търси точно определен клон.

V. Популацията от клетки от даден клон се умножава и по този начин се умножава и рекомбинантната ДНК. Тези клетки ще синтезират продукта, кодиран от рекомбинантната ДНК.



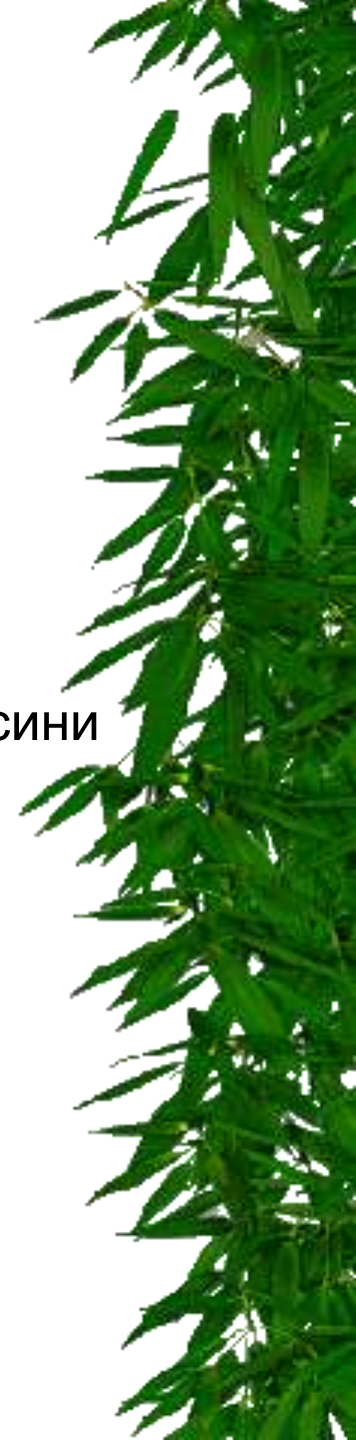
Производство на ваксина срещу вируса на хепатит В (HBV) чрез рекомбинантни ДНК технологии.

1. изолиране на гена за повърхностен белтък от HBV
2. включване на гена във вектор от дрожди
3. трансформиране на дрождевите клетки
4. селекция на дрождите, които съдържат вектора с гена за повърхностен белтък в HBV
5. размножаване на дрождите в клетъчна култура
6. изолиране на клетките чрез центрофугиране
7. разрушаване на клетките от дрожди изолиране на повърхностен белтък от HBV



Продукти на ДНК - клонирането

- * инсулин
- * Човешки растежен хормон
- * фактор VIII, необходим за кръвосъсирването
- * фоликулостимулиращ хормон
- * интерферон
- * растежни фактори (еритропоетин)
- * интерлевкини
- * вирусни антигени за ваксини
- * антитела за пасивна имунизация



Инструменти на рекомбинантните ДНК технологии

Рестрикционни ендонуклеази



Рестрикционни ендонуклеази

- ★ Рекомбинантните ДНК технологии стават възможни след откриването на **рестрикционните ендонуклеази** от **Werner Arber, Daniel Nathans, и Hamilton Smith**, за което те получават Нобелова награда за медицина 1978 г.
- ★ Действие на рестрикционните ензими върху **палиндроми (напълно симетрични обърнати повтори)**



Произход и функции

- ★ Бактериален произход - ензими разкъсващи чужда ДНК. Предпазват бактериите от бактериофаги
 - Ограничават репликацията на вируса
- ★ Бактериите предпазват собствените си ДНК от собствените си рестриктази чрез метилиране на специфичните секвенции, които са субстрат за рестриктазите
- ★ Имената им са свързани с организмите от които са изолирани. Означават се с първата буква от родовото наименование, двете първи букви от видовото й, буква или число означаващо щама и римска цифра, за кой по ред на изолиране е ензимът.
 - ✓ EcoRI от *Escherichia coli*
 - ✓ BamHI от *Bacillus amyloliquefaciens*
 - ✓ MstII от *Microcoleus sp.*



Видове рестриктази

★ Тип I и III

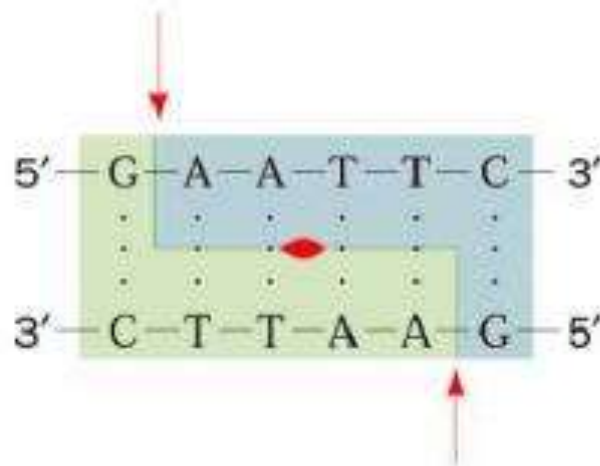
- **I:** Отрязва ДНК на неспецифични места на различни разстояния от секвенциите, разпознавани от рестриктазата – получават се случайни, неточни отрязъци. Не се използват много в рекомбинантните технологии.
- **III:** Група включваща рестрикционни и модифициращи ензими
- Отрязват извън мястото на разпознаване и изискват две еднакви последователности в обратен ред за да осъществят разрязването
- Не се използват за лабораторни цели и не се предлагат като търговски продукти



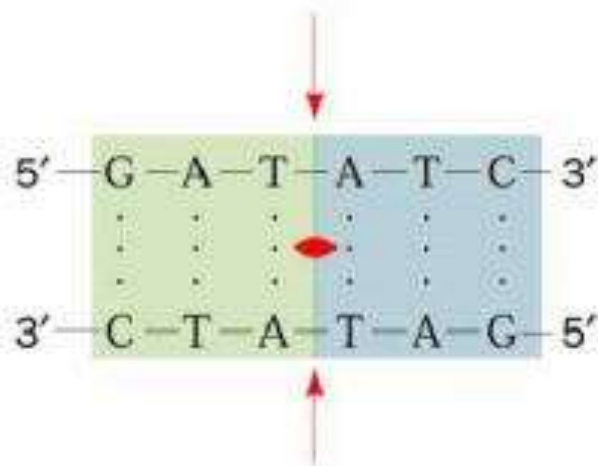
★ Тип II

- Срязва двете вериги на ДНК в точно определена последователност
- Широко приложение в рекомбинантните технологии
- Някои ензими срязват двете вериги в несрещуположни точки и се получават “лепливи краища”
- Други ензими срязват в срещуположни точки и се получават “слепи/тъпи краища”

(a) *EcoRI*

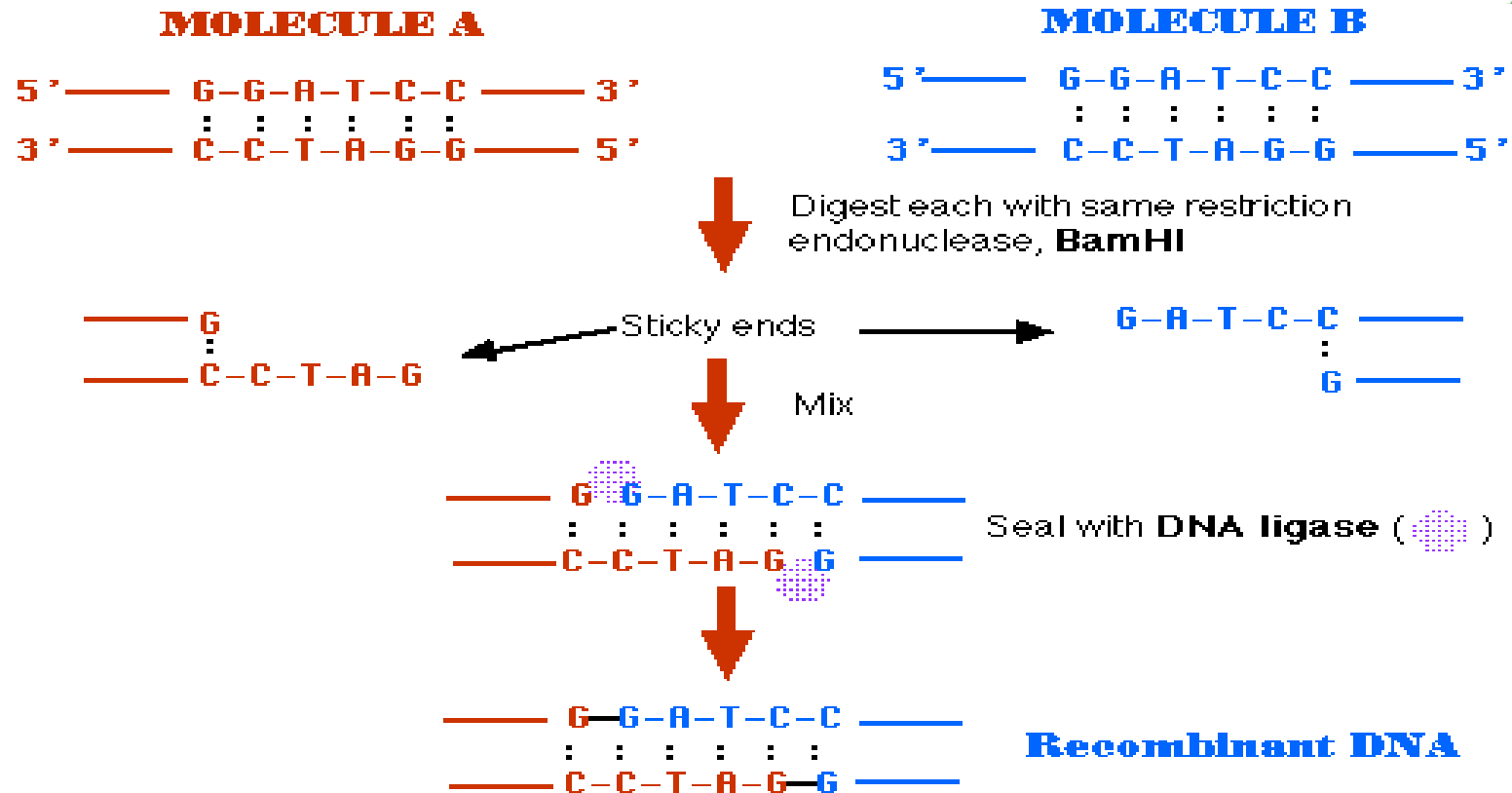


(b) *EcoRV*



Тип II

- Възможно е образуване на Н-връзки с комплементарни “лепливи краища”
- **ДНК лигаза** катализира създаването на фосфодиестерна връзка



Геномни и кДНК библиотеки

- ★ **Библиотека** - Съвкупността от клонове, съдържащи фрагменти ДНК от един източник
- ★ **Геномна библиотека** - когато ДНК от цял геном е нарязана и съхранена на различни фрагменти
- ★ **кДНК библиотека** - цялата колекция от клонове, произлезли от един препарат информационна РНК. Нарича се още **генна**, защото обхваща работещите гени в изследваната тъкан. В кДНК не са включени интронните последователности – защо?



Полиморфизми в дължината на рестрикционните фрагменти

- * Английското съкращение **RFLPs** идва от restriction fragment length polymorphisms.
- * Вяка рестриктаза разпознава специфична нуклеотидна последователност
- * Поради точкова мутация специфичното място за разпознаване от определена рестриктаза може да се промени и се получава по-дълъг или по-къс рестрикционен фрагмент.
- * Методът, използващ RFLPs за установяване на уникални за даден индивид профили на ДНК фрагменти, се нарича **фингерпринтинг** .
- * Така се установява мутацията, която причинява **сърповидноклетъчната анемия** - премахва рестрикционното място за ензима *MstII* в β -глобиновия ген.



Вектори

- ✱ Вектори са молекули ДНК, способни самостоятелно да се самовъзпроизвеждат (бактериални плазмиди или вирусни фаги).
- ✱ Изборът на вектор зависи от типа на експеримента
- ✱ Повечето вектори съдържат репликационен сегмент с прокариотен произход, което позволява въвеждането им в бактериални клетки
- ✱ Някои вектори съдържат допълнително еукариотно начало за репликация, което позволява самостоятелна репликация в еукариотни клетки
- ✱ Прокариотно и еукариотно начала за репликация - шатъли/свалки



Вектори и генно клониране

- ✱ Често са включени множество **уникални места за клониране** за по-лесно конструиране на генни библиотеки.
- ✱ Идентифицирането на клетките, съдържащи желаните вектори се постига с включването на **гени за резистентност към антибиотици** или др. селективни маркери
- ✱ Някои вектори съдържат индуцируеми или тъканно-специфични **промотори**, позволяващи контролираната експресия на желания ген в клетката с трансфекция или в трансгенното животно



Видове вектори

- ★ плазмиди, бактериофаги, козмиди, бактериални изкуствени хромозоми (bacterial artificial chromosome - BAC), дрождени изкуствени хромозоми (yeast artificial chromosome YAC), ретровируси,

- ★ Изборът на вектор зависи от:
 - протокола и целите на експеримента
 - Типа на клетката реципиент на рекомбинантната ДНК
 - ★ Прокариотна
 - ★ Еукариотна



Плазмиди

- ★ Ковалентно свързани, кръгови, двойноверижни ДНК молекули, които се откриват в бактериите и се реплицират отделно от бактериалната хромозома
- ★ Съдържат гени за резистентност на бактериалните щамове към различни медикаменти (антибиотици)
- ★ Съдържат начало на репликация (Origin of replication - ORI)



Бактериофага Ламбда

- ✱ Бактериофага lambda (λ)
инфектиращ E. coli
- ✱ Двойноверижна, линейна ДНК.
Подходящ за конструиране на генни
библиотеки
- ✱ Може да побере големи сегменти
чужда ДНК (до 35-45 нд)



Козмиди

- ★ Хибридни молекули, съдържащи компоненти от фага ламбда и ДНК на плазмид
- ★ Компонент от Ламбда: COS последователност (необходима за *in vitro* пакетиране в обвивките на фага)
- ★ Компонент от ДНК на плазмидата: ORI + ген за резистентност към антибиотик



Бактериални изкуствени хромозоми (bacterial artificial chromosome - BAC),



- * На основата на F плазмид. Побира 1 Mb ДНК (= 1000kbp)
- * Малък брой копия плазмиди (обикновено по 1 за клетка), което предотвратява възможността за кросинговър между повторените последователности във включената ДНК
- * Но малък брой копия означава малък ДНК добив
- * Трансформира се в *E. coli* чрез поставяне на бактериите във високоволтово електрично поле (електропориране)
- * BACs понастоящем са най-често използваните вектори за големи инсерти като **еукариотни геномни проекти**.

Дрождени изкуствени

хромозоми (Yeast artificial chromosomes - YACs)

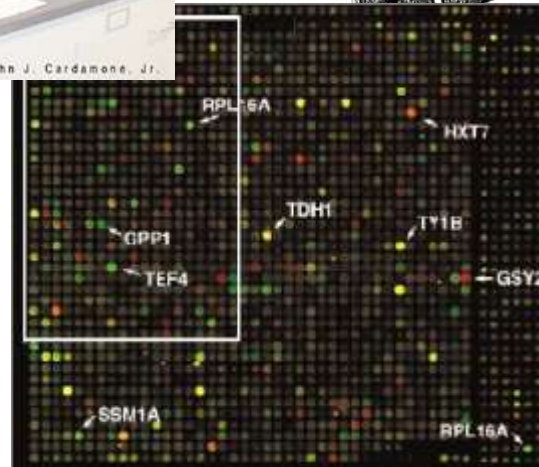
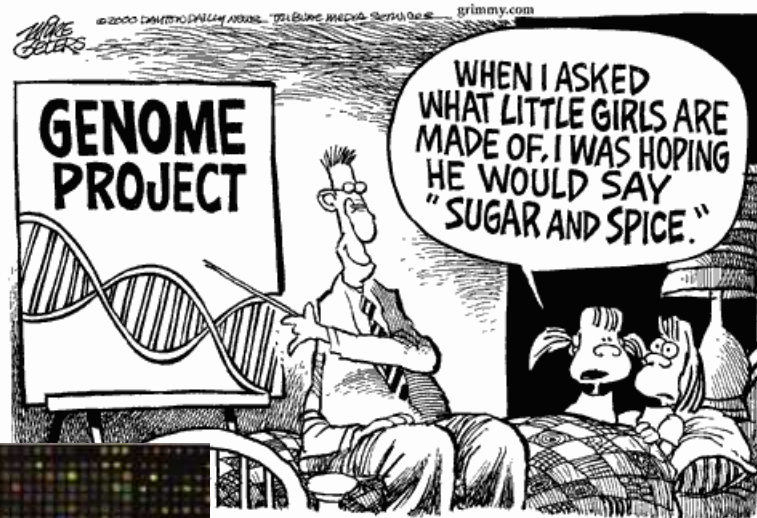
- * Хибридни молекули, съдържащи компоненти от дрожди, протозои и бактериален плазмид >1Mb (1000kbp = 10^6 bp)
 - Дрожди:
 - * ORI = ARS (автозомно реплицираща се последователност)
 - * Селективни маркери за всяко рамо на хромозомата
 - * Центромер
 - Протозои= Tetrahymena - Теломерни последователности
 - Бактериален плазмид
 - * Полилинкер - малък олигонуклеотид с нагъсто събрани прицелни места за действието на редица рестриктази

Човешки изкуствени хромозоми

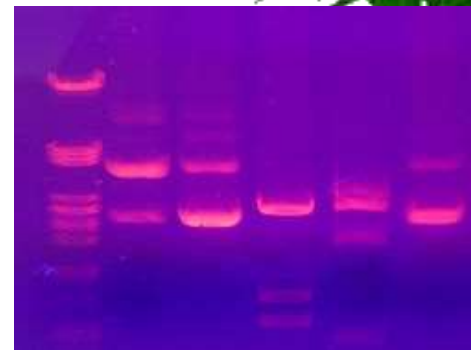
- ✱ Разработени през 1997 – самореплициращи се
- ✱ ~1/10 от размера на нормална хромозома
- ✱ Микрохромозома, която преминава в клетката по време на митоза
- ✱ Съдържа:
 - ORI
 - центромер
 - теломер
 - Предпазна шапка от повтарящи се ДНК-последователности в края на хромозомата (предпазва от скъсяване по време на митоза)
 - Хистони, доставени от клетката реципиент



Методи на рекомбинантните ДНК - технологии



Идентифициране на ДНК-секвенции. Електрофореза



- ✱ ДНК молекули с различни размери се разделят чрез гелна електрофореза с:
- ✱ най-късите фрагменти се придвижват най-далече в гела, докато най-дългите са близо до старта
- ✱ електрофореза в полиакриламиден гел за по-малки молекули ДНК - **установяват се разлики в дължината дори с един нуклеотид.** Това позволява определяне секвенцията на базите в ДНК.
- ✱ електрофореза в агарозен гел за по-големи молекули ДНК

Southern блотинг техники

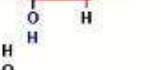
- ★ Разработена от Ed **Southern** (1975) – използва се за различни цели, включително и за скриниране на геномни библиотеки
- ★ Етапи:
 1. ДНК се накъсва с рестриктази и се разделя в агароза чрез електрофореза
 2. Гела се третира с NaOH за да се денатурира ДНК (ds DNA → ss DNA)



3. ДНК се прехвърля от гела върху нитроцелулозна или др. мембрана по капилярен път или електрически трансфер
4. Инкубация с едноверижна ДНК сонда (беязяна с радиоактивност или флуоресценция) → Свързва се само с комплементарния си участък.
5. Регистрация на свързването с авторадиография или хемилуминисценция

рестрикционна карта на ДНК фрагмента – постига се с повторението на блотинга с различни рестриктази и различни сонди



- Normal nucleotides:**
- 
- Dideoxy Chain Terminators:**
- 

	G	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	T	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	G	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	G	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	A	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	C	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	A	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	T	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	C	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	G	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	C	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	A	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	A	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	C	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	A	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	C	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	C	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	T	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	G	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	C	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	G	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	T	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG



Хибридизация на НК

- ★ **ДНК денатурация** – при 98°C и $\text{pH} > 13$ се разкъсват водородните връзки между комплементарните вериги в молекулата
- ★ **Ренатурация** – възстановяване на водородните връзки при 68°C
- ★ **Хибридизация** – ренатурация между вериги от различни молекули ДНК.
- ★ **ДНК сонда** - ДНК фрагмент се белязан с P^{32} , така че неговото включване в двойноспиралната молекула може да се проследи при хибридизацията. Сондата може да съдържа 15 до 1000 нд. Служи за скриниране на геномни библиотеки



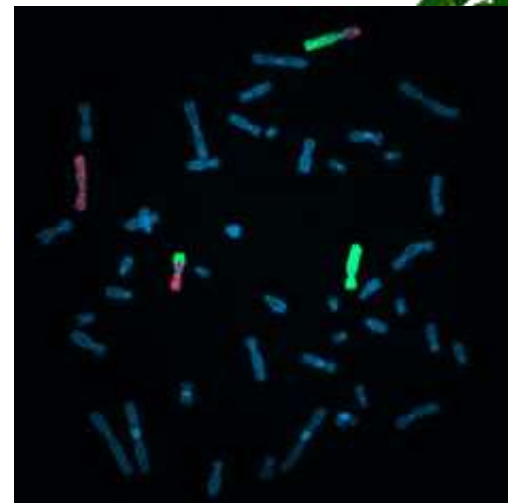
Техники за хибридизация

- ★ **хибридизация *in situ*** - откриват се специфични секвенции на нуклеинови киселини в хромозомите и клетките (ДНК в хромозомите и за РНК в клетките). Въздейства се с много високо рН, за да се разкъсат връзките между двойките бази на ДНК спиралата (денатурация) Хромозомната област, закрепила сондата, се визуализира с авторадиография или



FISH – fluorescent *in situ* hybridisation - флуоресцентна хибридизация на място

- ★ Използват се сонди, маркирани с **флуоресцентни багрила**, които се проявяват при специални условия . Участъци ДНК по дължината на хромозомите светят с различен цвят под флуоресцентен микроскоп
- ★ Приложение: диагностициране на серия хромозомни заболявания



Полимеразна верижна реакция (**PCR**; polymerase chain reaction)

- * чрез **полимеразна верижна реакция** подбрани ДНК сегменти да се клонират извън организма в епруветка, бързо и без нужда от живи клетки. Mullis (1985)
- * Приложения:
 - подходящ за амплифициране на ДНК за клинични изследвания или съдебно-медицински тестове, тъй като като изходен материал може да бъде дори само един косъм от човешка коса, една капка кръв или сперма.
 - Чрез PCR може да се откриват **инфекциозни агенти**, особено латентни вируси,
 - да се откриват **алелни полиморфизми** ,
 - да се установи точно типът на **тъкани за трансплантация**,
 - да се изучава **еволюцията**, използвайки ДНК от археологични проби



PCR теория

- ★ PCR произвежда голямо количество копия на желан ген в три основни стъпки. Тези стъпки се повтарят около 30 или 40 цикъла. Апаратът се нарича PCR. PCR апаратът бързо загрява и охлажда реакционната смес.
- ★ Стъпка 1 - **PCR Денатурация при 94 °C**
Двойната верига се топи (разгражда) до едноверижна ДНК
- ★ Стъпка 2 **Хибридизация** с кДНК олигонуклеотидни последователности
Праймерите се свързват към единичната верига (в комплементарен участък)
- ★ Стъпка 3 **PCR удължаване при 72 °C**
PCR Taq полимераза добавя dNTP от 5' към 3' края, разчитайки шаблона от 3' към 5' края, за да се синтезират две двойноверижни молекули. PCR стъпките се повтарят.

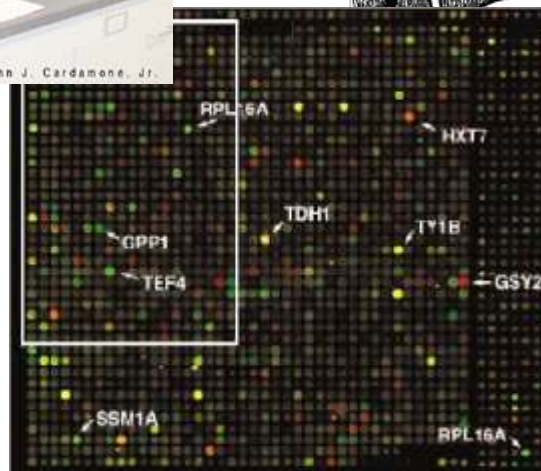
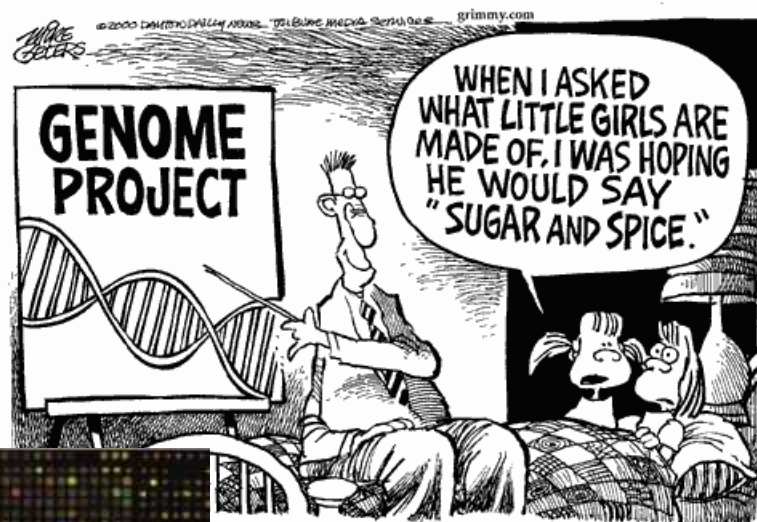


Основни ограничения на PCR

- ✱ Не може да измести напълно бактериално-векторното клониране защото:
- ✱ Само сравнително къси последователности (до 10 kbp) могат да бъдат амплифицирани (намножавани).
- ✱ Необходимо е да се знае точния нуклеотиден състав от двата края на последователността, която ще се амплифицира. Ако два свързани гена са еднакви в краищата си, може да се амплифицира грешен ген.
- ✱ ДНК фрагмента само се умножава. За да се изследва неговото действие е необходима експресията му в жив организъм (клониране).



Приложения на рекомбинантните ДНК - технологии



Генна терапия

- приложен клон на генното инженерство, който модифицира генома на соматични или полови клетки с **лечебна цел**
- ★ *Внасят се:*
 - ★ ► **нормални гени** - заместват дефектните;
 - ★ ► **анормални гени** - спират нежелана репликация (HIV);
 - ★ ► **протекторни гени** - предотвратят аномално развитие на клетки със злокачествен потенциал.



Генна терапия

В прицелната клетка терапевтичните гени:

1. **се интегрират в гостоприемниковата ДНК със стабилна и дълготрайна експресия.** Възможни негативи : да не се експресират, ако се интегрират към кондензиран хетерохроматинов участък; да причинят клетъчна смърт, ако изместят жизнено важен за клетката ген; да активират онкоген или да инактивират туморно-супресорен ген.
2. **остават свободни, без да се интегрират,** краткотраен ефект.

Клинично приложение на генната терапия

- ★ *ex vivo* - собствени клетки на пациента се изваждат от организма и *in vitro* се трансформират, селектират и клонират и отново се внасят у болния
- ★ *in vivo* - клонирани нормални гени се внасят директно в клетки на пациента, които не могат безпрепятствено да се извеждат от организма - например мозъчни клетки
- ★ терапевтичните гени се внасят в увредените прицелни клетки чрез преносители (вируси)



Генна терапия за остър комбиниран имунодефицит (severe combined immunodeficiency (SCID))

- ★ Успешна за 15 бебета момчета от Франция, страдащи от Х-свързан SCID, причинен от мутантен алел за субединица, наречена γ c (гама-с) — върху рецептора за няколко интерлевкини, включително и IL-7.
- ★ IL-7 е есенциален за превръщането на кръвните стволови клетки в предшественици на Т клетки. Момчета с такъв вид Х-SCID мутантен алел не реагират с имунен отговор на антигенен стимул
- ★ Изолирани са кръвни стволови клетки от костния мозък на всяко дете. Клетките се третират с вектор, съдържащ нормален ген за γ c и се връщат отново в донора.
- ★ Резултат: Тези момчета са способни да водят нормален живот в нестерилна среда и имат нормален брой Т клетки.



Генна терапия на аденозин дезаминазна недостатъчност

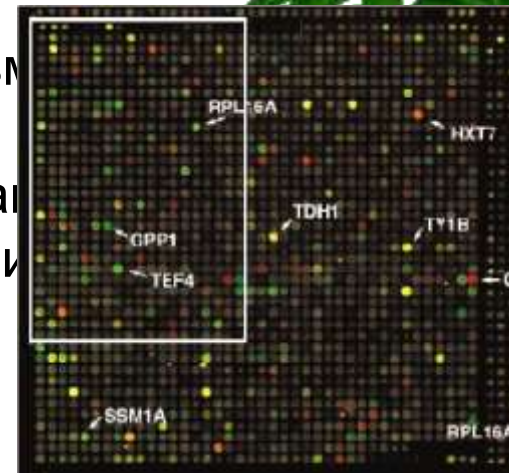
- * Ензимът аденозин дезаминаза катализира превръщането на аденозин в инозин и на дезоксиаденозин в дезоксиинозин.
- * Недостатъчност на аденозин дезаминазата се дължи на мутация в гена за ензима и води до тежка комбинирана имунна недостатъчност по неизяснен механизъм.
- * Деца с този дефект умират още през първите години след раждането от инфекциозни заболявания, с които не могат да се справят.
- * При пациентка с това заболяване (малко 4-годишно момиче) са изолирани Т клетки от периферна кръв и стимулирани да се размножават в клетъчна култура с подходящи растежни фактори.
- * С помощта на специално конструиран ретровирус се въвежда генът за аденозин дезаминазата, така че да може да се експресира в човешките клетки, но вирусът да не може да се реплицира.
- * Модифицираните Т клетки, съдържащи вече нормален ген за аденозин дезаминаза, са били въведени отново в кръвта на пациентката. Дори 10% активност на ензима от нормата са били достатъчни да нормализират пациентката.



ДНК - чипове в диагностиката

DNA microarray

- ★ Нова техника за проследяване на генната експресия и бързо изследване на гените за мутации и вариации в секвенцията на ДНК.
- ★ Голям брой ген-специфични олигонуклеотидни проби имобилизирани върху определено място на твърда матрица, наречена **чип**, т. е. всяка проба е фиксирана на определен "адрес". Едновременно множество генетични тестове
- ★ Към генните чипове хибридизират белязани нуклеинови киселини (ДНК или РНК) от определени клетки на изследвания организъм.
- ★ Хибридизацията на тези белязани ДНК или РНК към комплементарна секвенция на някоя от пробите ги имобилизира на определено място върху чипа и така доказват и се определят количествено специфични секвенции в изследваната нуклеинова киселина.



Обратна генетика - функционално клониране

- ★ Познаваме белтъка и търсим неговия ген
- ★ От пречистения интересуващ ни белтък, по обратен път се стига до клониране на гена и се определя нуклеотидната му последователност
- ★ Създава се мутантен ген , който се прехвърля в клетка и се интегрира в хромозомата чрез генна рекомбинация - става постоянна част от клетъчния геном



Антисенс РНК

- Антисенс НК – комплементарна на иРНК = > блокира иРНК транслацията.
- Въвеждането на антисенс НК помага да се разкрие функцията на протеина, кодиран от тази последователност
- Синтетични ДНК олигонуклеотиди са синтезирани за да инхибират вирусни инфекции, включително и HIV в клетъчна култура
- Приложение: въвеждане на антисенс HIV нуклеинова киселина в костномозъчни клетки от пациенти



Трансгенни животни

- ★ Животни, експресиращи гени от други организми
- ★ Множество копия от гени се инжектират в оплодена яйцеклетка и чуждата ДНК се включва случайно в генома
- ★ Оплоденото яйце се въвежда в майка заместител
- ★ В някои трансгенни животни се произвеждат протеини с терапевтична стойност
 - Коагулационни фактори, фибриноген, моноклонални антитела, човешки хемоглобин, серумен албумин
- ★ Трансгенните растения са с увеличен размер на добива, резистентни към студ, насекоми и др. вредители



„Нокаут“ - организми

- * Определени гени се нокаутират (трайно се стопира експресията им) като по този начин се съди за функциите им
 - Пречистения ген се инактивира – например чрез сливане с друг ген
 - Инактивираният ген се въвежда в ембрионални стволови клетки, така че да замести нормалния ген
 - Модифицираните стволови клетки се въвеждат в развиващ се бластоцист, който се инплантира в матка за да продължи развитието си.
 - Поколението, произхождащо от този бластоцист е с нефункциониращ целеви ген
 - Нокаут-организмите са идеален модел за проучване функцията на гените.
 - формира се направление **геномика**, което освен от структурата и изолирането на гените се стреми да определя и тяхната функция - производната им РНК и белтъци

