

ТЕМА № 8: МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ СТРУКТУРИ І ФУНКЦІЇ КЛІТИННИХ ДНК

ПЛАН:

1. Рестрикуючі нуклеази
2. Конструювання рекомбінантних ДНК
3. Визначення нуклеотидної послідовності (секвенування) ДНК
4. Гібридизація, як високочутливий метод виявлення специфічних послідовностей нуклеотидів
5. Клонування ДНК
 - 5.1 Етапи отримання клонів
 - 5.2 Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)
6. Генна терапія

Сучасні методи вивчення ДНК відомі під назвою «Технологія рекомбінантних ДНК». Технологія рекомбінантних ДНК включає в себе наступний набір методів:

1. Специфічне розщеплення ДНК рестрикуючими нуклеазами, що істотно прискорює виділення і маніпуляції з різними генами;
2. Швидке секвенування всіх нуклеотидів в очищеному фрагменті ДНК, що дозволяє визначити точні межі гена;
3. Гібридизація нуклеїнових кислот, що дозволяє виявляти специфічні послідовності РНК або ДНК з великою точністю і чутливістю на підставі їх здатності зв'язувати комплементарні послідовності нуклеїнових кислот;
4. Клонування ДНК: обраний фрагмент ДНК уводять в самореплікуючий генетичний елемент (вірус), який використовують для трансформації бактерій. Бактеріальна клітина після трансформації відтворює цей фрагмент в багатьох мільйонах ідентичних копій;
5. Генетична інженерія - послідовності ДНК змінюють з метою створення модифікованих версій генів, які потім знов уводять в клітини або організми.

1. РЕСТРИКУЮЧІ НУКЛЕАЗИ

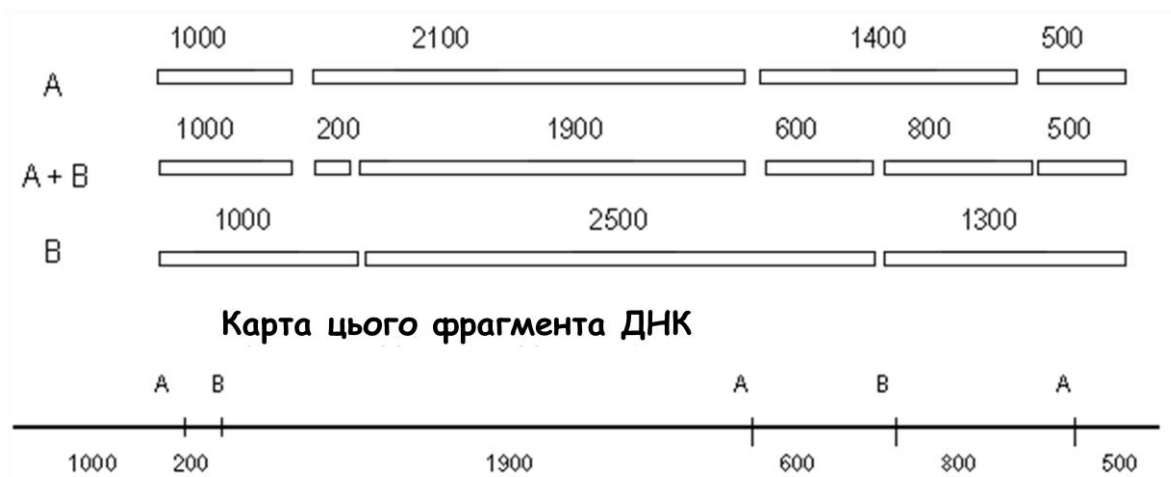
Виробляються у бактерій для захисту від чужорідних ДНК, що проникають у клітину. Кожний фермент розпізнає специфічну послідовність в ДНК із 4-6 нуклеотидів і негайно розрізає її ланцюги. Відповідні послідовності в геномі самих бактерій замасковані метильованими залишками А і С. Цей феномен взяли на озброєння для розділення ДНК у лабораторіях (фірми виробляють понад 100 таких ферментів, які розпізнають різні послідовності). Серії фрагментів, які утворюються, називаються рестрикційними фрагментами (рестриктами). Порівняння розмірів фрагментів ДНК, отриманих після обробки певної ділянки геному набором рестрикуючих нуклеаз, дозволяє побудувати рестрикційну карту, на якій вказано положення кожного сайту рестрикції щодо інших ділянок.

Приклад:

Молекулу ДНК довжиною 5000 п. н. обробляють окремо рестриктазами А і В. Фрагменти розділяють електрофорезом. Фермент А розрізав ДНК на 4 фрагменти

розміром 2100, 1400, 1000 і 500 п. н. Обробка рестриктазою В дала 3 фрагмента: 2500, 1300 і 1200 п. н. Для визначення розташування сайтів рестрикції цих ферментів на наступному етапі застосовують процедуру подвійного розщеплення – одночасно обробляють ДНК двома рестриктазами – А і В. Це дало 6 фрагментів: 1900, 1000, 800, 600, 500, 200 п. н.

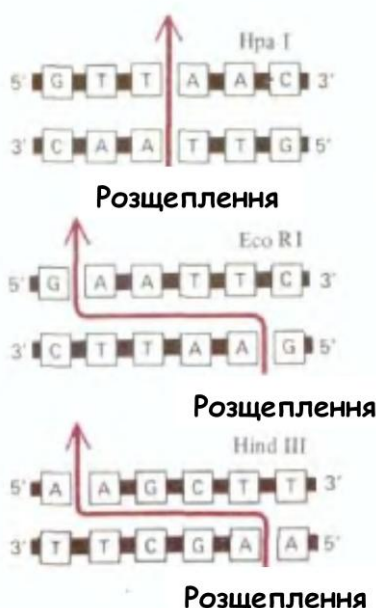
Аналіз фрагментів рестрикції і карта фрагменту ДНК



Карта цього фрагмента ДНК

2. КОНСТРУЮВАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК

Під рекомбінантними розуміють ДНК, утворені об'єднанням *in vitro* двох або більше фрагментів ДНК, виділених з різних біологічних джерел. Фрагменти ДНК, в тому числі і фрагменти, що містять гени, отримують з використанням ферментів рестриктаз. Багато рестриктаз розривають ланцюги ДНК зі зміщенням, тобто з утворенням на кінцях фрагментів коротких одноланцюгових ділянок. Ці ділянки мають здатність утворювати комплементарні пари основ з іншою одноланцюговою ділянкою, отриманою за допомогою того ж ферменту. Їх називають липкі кінці. У результаті отриманий фрагмент ДНК можна вбудувати в очищену ДНК вірусу або плазміди.



Зшивання фрагментів ДНК проводиться трьома основними методами, що залежать від того, які кінці мають фрагменти ДНК, що зшиваються.

1. Зшивання по "липким" кінцям (рестриктазно-лігазний метод)

Цей метод є найпоширенішим і популярним. Вперше цим способом гібридна ДНК була отримана С. Коеном із співробітниками в 1973 році.

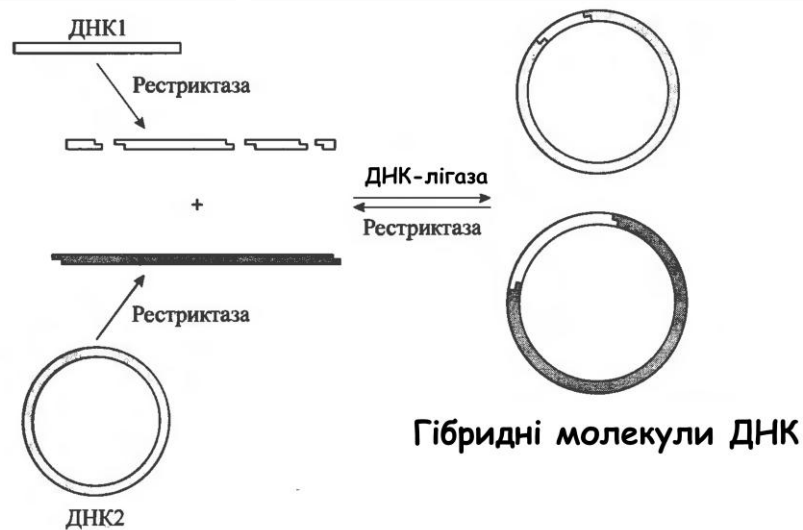


Схема рестриктазно-лігазного методу

Віруси або плазміди швидко реплікуються і в результаті можна швидко отримати велику кількість цього фрагмента, тобто клони фрагмента.

2. Зшивання по "тупим" кінцям (конекторний метод).

Липкі кінці також можна ферментативним шляхом приєднати до молекул ДНК з тупими кінцями. Для цього використовують фермент – кінцеву трансферазу з тимусу теляти, яка приєднує нуклеотиди до 3'-кінців ланцюгів ДНК.



Пришивання «липких» кінців і зшивання фрагментів ДНК

3. Зшивання фрагментів з різнойменними липкими кінцями

У ситуації, коли необхідно зшити фрагменти, утворені різними рестриктазами, і мають різні, тобто некомплементарні один одному липкі кінці, застосовують так звані лінкери (або "перехідники"). Лінкер - це хімічно синтезовані олігонуклеотиди, які представляють собою сайти рестрикції чи їх комбінацію. Вперше цю ідею запропонував Шеллер з співробітниками в 1977 році.

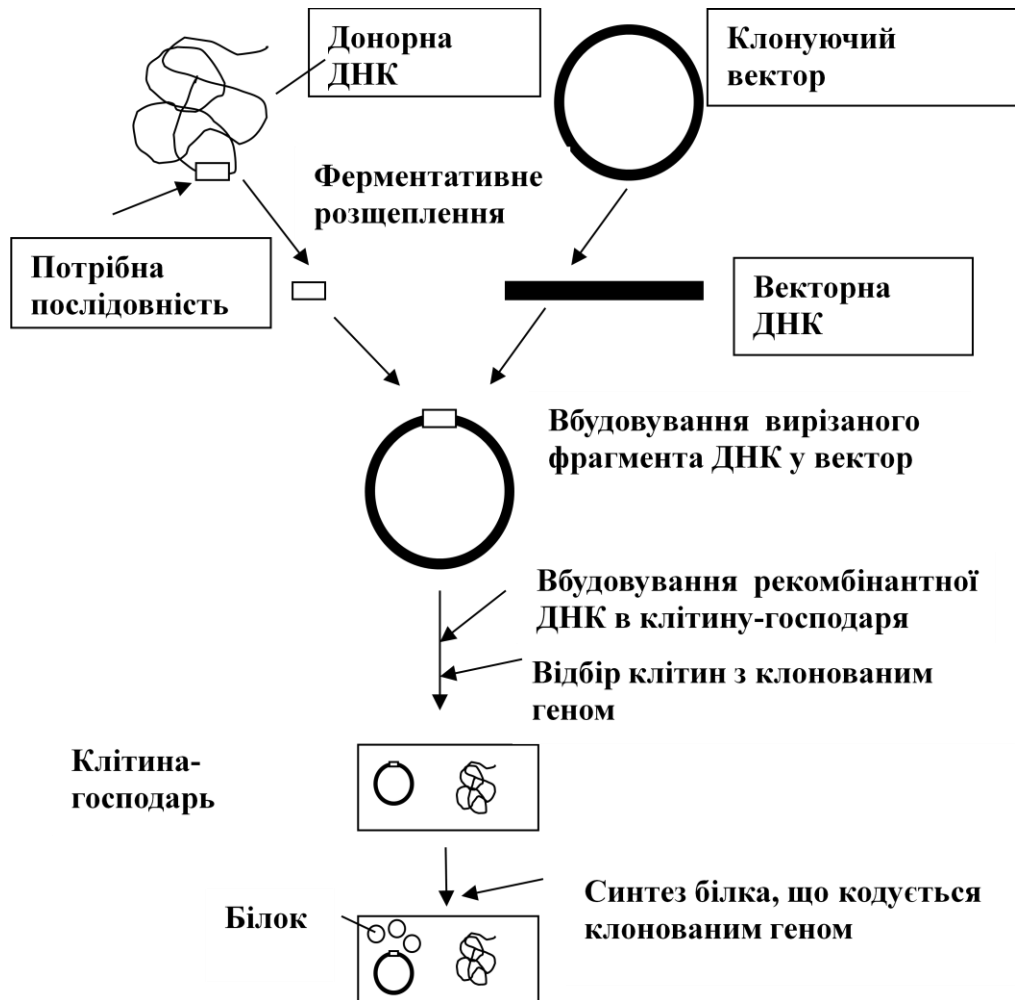
Технологія рекомбінантних ДНК

Технологія рекомбінантних ДНК (її називають ще молекулярним клонуванням або генною інженерією) - це сукупність експериментальних процедур, що дозволяє здійснювати перенесення генетичного матеріалу з одного організму в інший.

Експерименти з рекомбінантною ДНК проводять за наступною схемою:

- з організму-донора потрібних генів - екстрагують нативну ДНК, піддають її ферментативному гідролізу і з'єднують з іншою ДНК (вектор для клонування) з утворенням нової, рекомбінантної молекули.

- цю конструкцію вводять в клітину-хазяїна, де вона реплікується і передається нащадкам. Цей процес називається трансформацією.
- ідентифікують і відбирають клітини, що несуть рекомбіновану ДНК (трансформовані клітини).
- отримують специфічний білковий продукт, синтезований клітинами-хазяями, що служить підтвердженням клонування гену.



3. ВИЗНАЧЕННЯ НУКЛЕОТИДНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ (СЕКВЕНУВАННЯ) ДНК

Секвенування дозволяє досить швидко визначити повну нуклеотидну послідовність сегмента довжиною 100-500 нуклеотидних пар, що утворюються при розщепленні ДНК рестрикційними ендонуклеазами

МЕТОДИ:

1. *Метод Маскама і Гілберта (хімічний)*
2. *Дідезоксинуклеотидний метод Сенгера (ферментативний).*

Хімічний метод секвенування ДНК

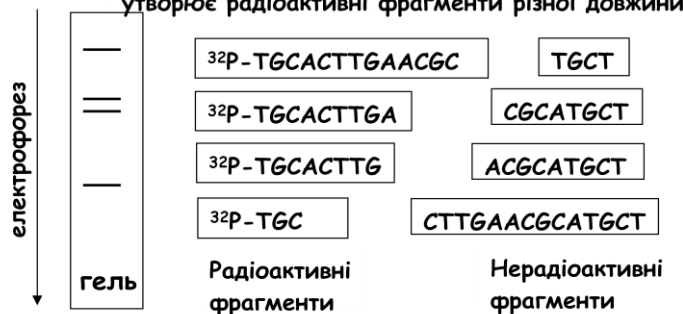
Така процедура виконується одночасно для 4 однакових проб ДНК. Використовують при цьому рестриктази, які розщеплюють ДНК в першому випадку по Т, у другому по С, в третьому по G і четвертому по А. Отримані зразки піддають електрофорезу на паралельних доріжках одного гелю. Аналізуючи результати

електрофорезу можна визначити послідовність нуклеотидів. Перша знизу смуга відповідає нуклеотиду, розташованому на 5'-кінці. При цьому визначають на якій з доріжок розташована смуга. Тут - Т. І так далі.

Вихідний фрагмент ДНК, мічений ^{32}P по 5'-кінцю

^{32}P -TGCACTTGAACGCATGCT

Сполука, що специфічно розщеплює ДНК по залишках А, утворює радіоактивні фрагменти різної довжини



При гелі-електрофорезі ці фрагменти поділяються суворо за розмірами; за допомогою радіоавтографії виявляються тільки радіоактивні фрагменти

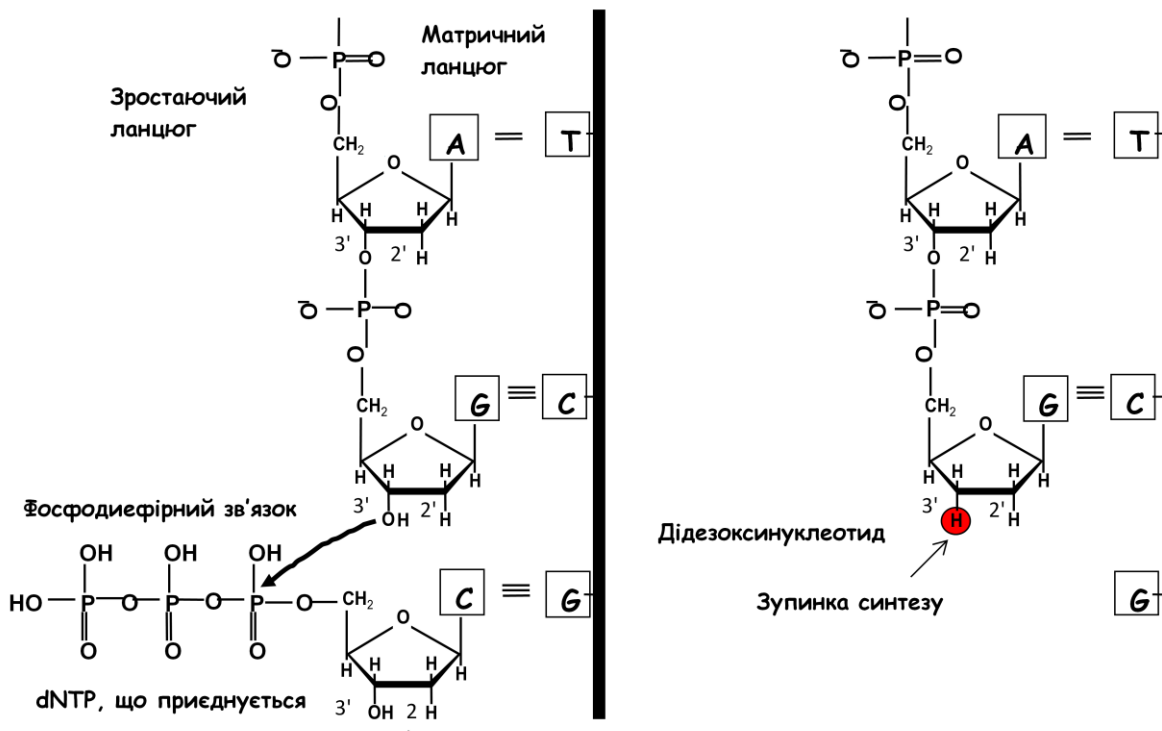
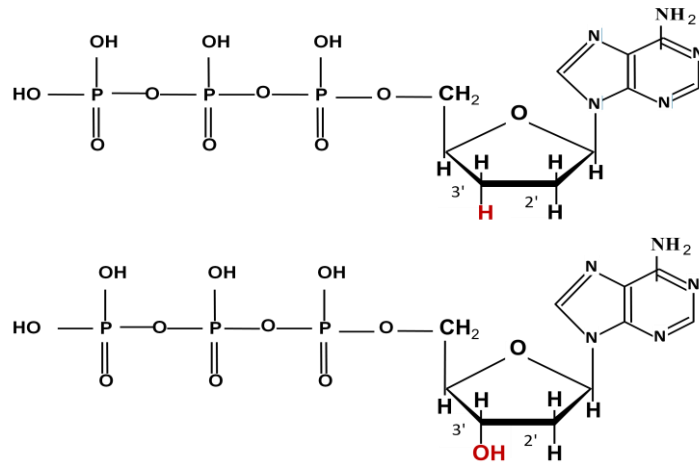
№	T	C	G	A
18	—			
17		—		
16			—	
15	—			
14				—
13		—		
12			—	
11		—		
10				—
9				—
8			—	
7	—			
6	—			
5		—		
4				—
3		—		
2			—	
1	—			

3' ↑ (left side)
↓ (right side) Напрямок електрофорезу
5' (bottom)

Послідовність ДНК, що прочитується з гелю знизу вгору, така:
TGCACTTGAACGCATGCT

Дідезоксинуклеотидний метод

Дідезоксинуклеотид - це штучно отриманий нуклеотид, позбавлений 2'- і 3'-гідроксильних груп при вуглецевих атомах цукрового кільця.



Подовження ланцюга під час реплікації ДНК відбувається в результаті приєднання чергового нуклеозидтрифосфату до 3'-гідроксильної групи останнього нуклеотиду зростаючого ланцюга. Якщо такою черговою приєднуючою ланкою є дідезоксинуклеотид, то синтез ДНК зупиняється, оскільки наступний нуклеотид не може утворити фосфодієфірний зв'язок.

Етапи:

1. Гібридація синтетичного олігонуклеотиду довжиною 17-20 нуклеотидів з ділянкою одного з ланцюгів досліджуваної ДНК.



3. Розчин з праймером розподіляють по 4 пробіркам, в кожній з яких знаходяться чотири дезоксинуклеотида, dATP, dCTP, dGTP і dTTP (один з них ізотопно

мічений) та один з чотирьох дидезоксинуклеотидів (ddATP, ddCTP, ddGTP і ddTTP). Концентрацію кожного дидезоксинуклеотида підбирають таким чином, щоб він виявився включеним за всіма позиціями у суміші зростаючих ланцюгів, а не тільки у першій позиції, яка йому зустрілася. Після приєднання дидезоксинуклеотида зростання ланцюга відразу зупиняється, тому кожний ланцюг закінчується 3'-дидезоксинуклеотидом.

4. Далі в пробірці додають формамід, для забезпечення розходження ланцюгів, і проводять електрофорез у поліакриламідному гелі на чотирьох доріжках. Це дозволяє розділити одноланцюгові фрагменти ДНК, навіть якщо вони розрізняються по довжині всього на один нуклеотид.
5. На радіоавтографі виявляється набір смуг, що відповідають міченим фрагментам ДНК, зіставлення яких дозволяє прямо «прочитати» нуклеотидну послідовність сегмента ДНК, який секвенірується.

Реакційна суміш	Праймер і довжина добуденої послідовності	Праймер і добудена послідовність
ddATP + чотири dNTP	Праймер + 3 Праймер + 7 Праймер + 8	Праймер-dGdCddA Праймер -dGdCdAdTdCdGddA Праймер -dGdCdAdTdCdGdAddA
ddCTP + чотири dNTP	Праймер + 2 Праймер + 5	Праймер-dGddC Праймер-dGdCdAdTddC
ddGTP + чотири dNTP	Праймер + 1 Праймер + 6	Праймер-ddG Праймер-dGdCdAdTdCddG
ddTTP + чотири dNTP	Праймер + 4 Праймер + 9	Праймер-dGdCdAddT Праймер-dGdCdAdTdCdGdAdAddT

Сама «швидка» смуга (радіоактивно мічений фрагмент у самому низі гелю) відповідає найкоротшому фрагменту і знаходиться в доріжці ddATP; наступні смуги розташовуються відповідно в доріжках ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP.

ddATP	ddCTP	ddGTP	ddTTP	3'
			—	T
—				A
—				A
		—		G
	—			C
			—	T
—				A
	—			C
		—		G
				5'

4. ГІБРИДИЗАЦІЯ, ЯК ВИСОКОЧУТЛИВИЙ МЕТОД ВИЯВЛЕННЯ СПЕЦИФІЧНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ НУКЛЕОТИДІВ

При нагріванні розчину ДНК до 100°C ланцюги ДНК дисоціюють (процес денатурації ДНК). Якщо далі витримати ці комплементарні ланцюги при температурі 65°C , вони легко спарюються і відновлюється подвійна спіраль. Цей процес називається ренатурація або гібридизація.

Ці процеси відбуваються між ДНК-ДНК, ДНК-РНК, ДНК-РНК при комплементарній послідовності нуклеотидів. Ця властивість дала можливість визначати концентрацію будь-яких послідовностей РНК або копій одного гена ДНК. Для цього необхідно мати чистий одноланцюговий фрагмент ДНК, комплементарний до тієї послідовності, яку треба виявити. Цей фрагмент отримують клонуванням або синтезують хімічними методами (якщо послідовність коротка). Його мітять ^{32}P для стеження за включенням цієї молекули до складу майбутнього подвійного ланцюга. Така одноланцюгова молекула називається ДНК-зонд. За допомогою нього можна ідентифікувати послідовність ДНК або РНК та їх кількість копій, тобто концентрацію. Штучно отримані ДНК-зонди дозволяють виявляти різні мутації в невеликих генах у допологовій діагностиці (у ембріональних клітинах). Для цього синтезуються два ДНК-зонди: один з нормальною послідовністю нуклеотидів, інший - з передбачуваною мутацією, а саме із заміною будь-якого нуклеотиду, який в результаті обумовлює хворобу (так визначають серповидно-клітинну анемію, діабет).

5. КЛОНУВАННЯ ДНК

Після того, як ДНК зшита в пробірці, її необхідно розмножити. Існує два підходи до клонування ДНК:

1. Використання бактеріальних або дріжджових клітин для розмноження введеної в них чужорідної ДНК.
2. Ампліфікація ДНК *in vitro* (ПЛР).

5.1 Етапи отримання клонів:

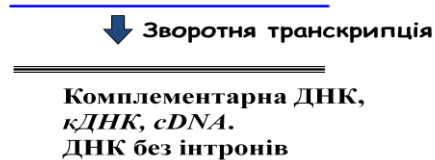
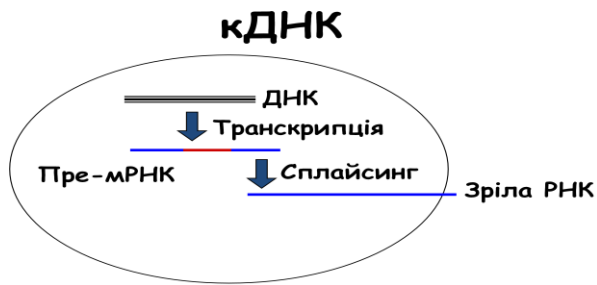
1. Клонування *in vivo*.

- 1) виділення ДНК і розщеплення рестриктазою, утворення величезної кількості фрагментів ДНК (у ссавців до 10^5-10^7).
- 2) отримання в процесі клонування великої кількості колоній (клонів) вірусів (плазмід), де кожна колонія містить свій вбудований фрагмент.
- 3) виявлення того клону, який містить потрібний фрагмент ДНК.

2. Утворення кДНК.

- 1) Виділення мРНК із клітин.
- 2) Побудова на мРНК за допомогою зворотної транскриптази (цей фермент синтезують віруси) одного ланцюга ДНК. Вона називається ДНК-копія (кДНК).
- 3) Добудовування другого ланцюга ДНК.
- 4) Клонування вже відомої ділянки ДНК.

Переваги кДНК перед клонами геномної ДНК у тому, що кодуюча білок нуклеотидна послідовність гена нічим не переривається.



5.2 Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

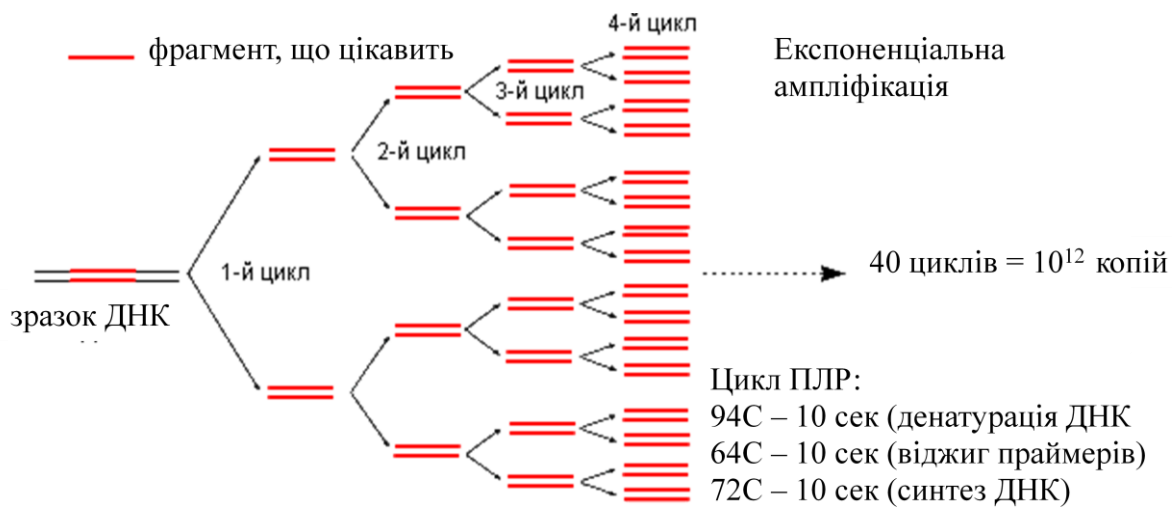
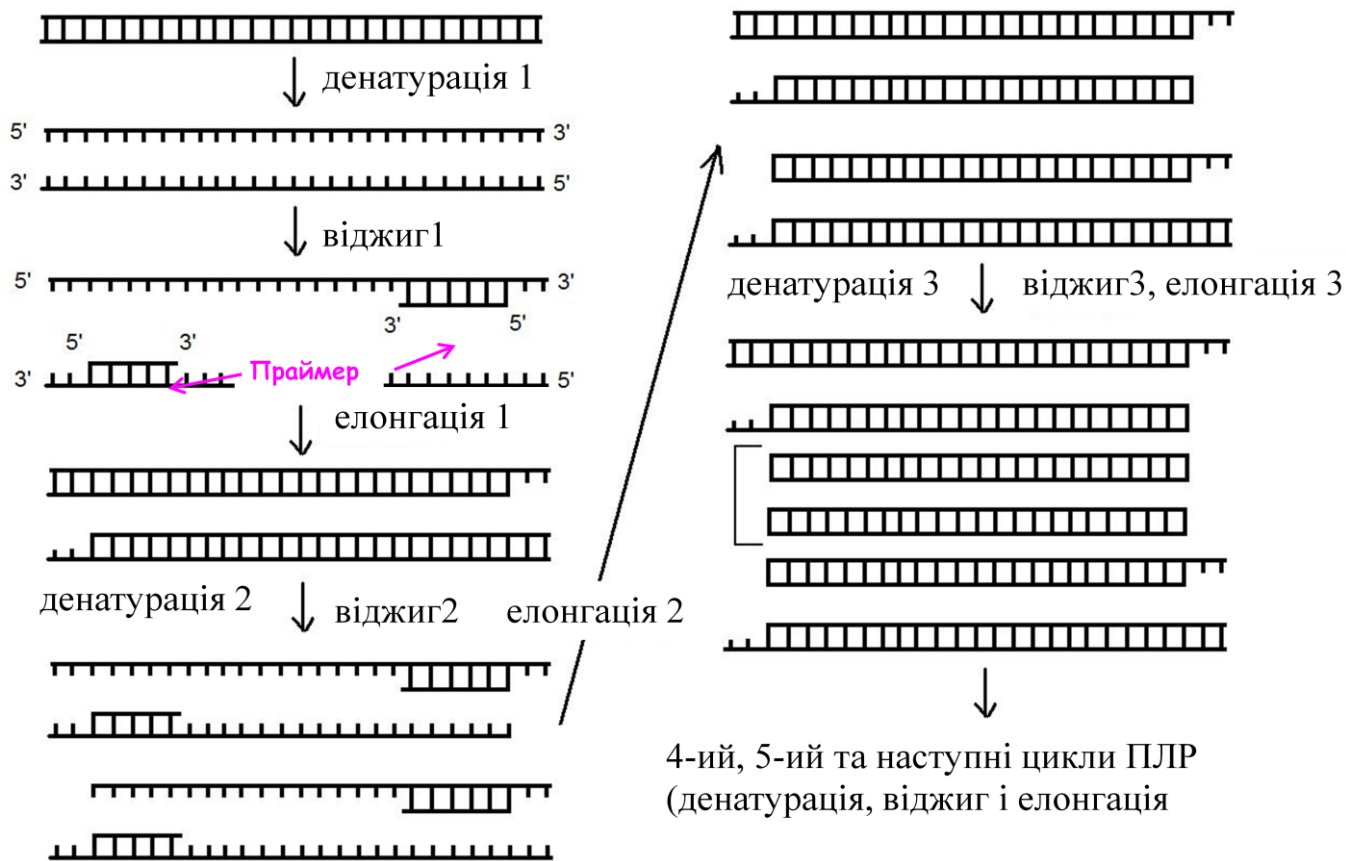
Розроблена у 1985 році К. Мюллісом із співробітниками. У 1993 р. – Нобелівська премія.

ПЛР дозволяє ампліфікувати (розмножити) ДНК з якої-небудь ділянки геному більш ніж у мільйон разів. Ділянки, що оточують обрану для ампліфікації область, використовують для приготування 2 синтетичних ДНК-олігонуклеотидів. Вони слугують затравками при синтезі ДНК *in vitro* для ДНК-полімерази.

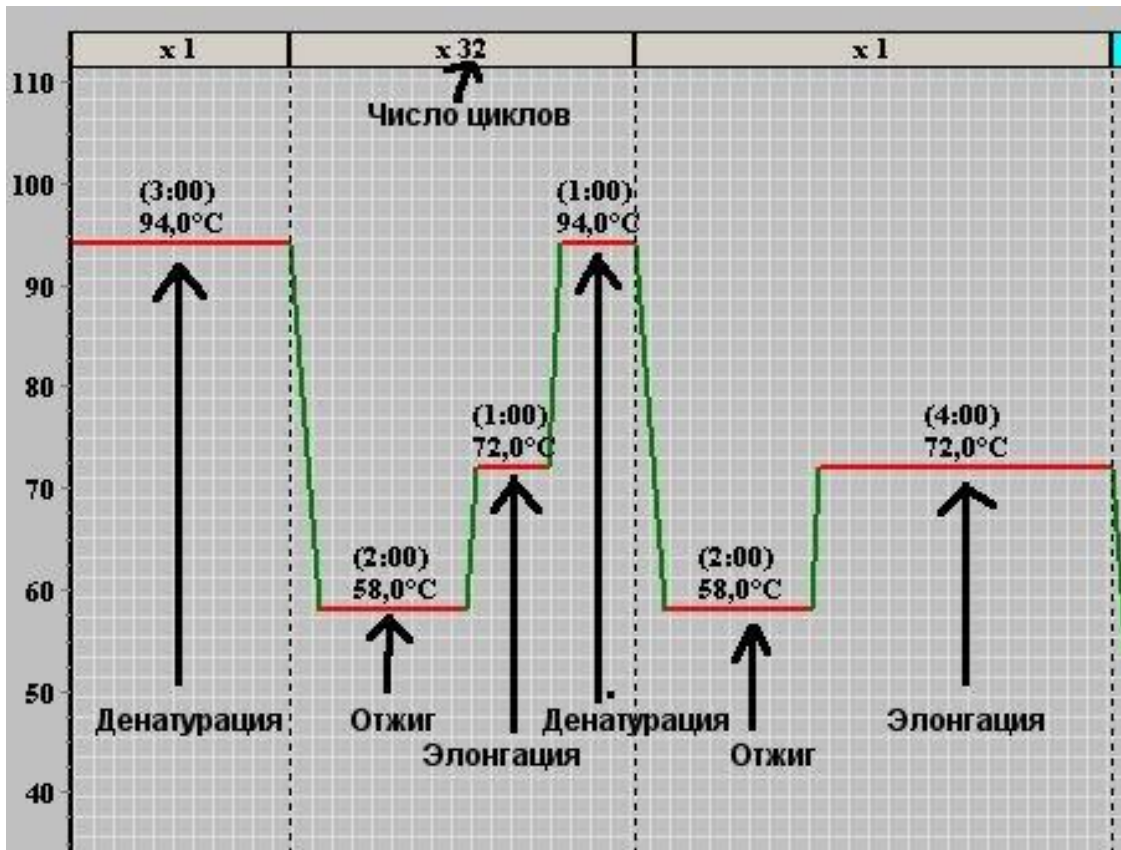
Принцип реакції:

1. Нагрівання ДНК для розділення ланцюгів (до 90-95⁰С).
2. Охолодження ДНК в присутності великого надлишку двох ДНК-олігонуклеотидів. У результаті вони гібридизуються з ДНК. Цей процес називається віджиг (60-70⁰С).
3. Суміш інкубують з ДНК-полімеразою та 4 видами dNTP. У результаті відбувається подвоєння фрагмента ДНК або навіть РНК.

Надалі ці етапи знову послідовно повторюються. У результаті утворюється величезна кількість копій, навіть якщо в пробі була всього одна молекула ДНК. Так визначають різні приховані або уповільнені інфекції, які зовні ніяк не проявляються; в судовій медицині.



Програма проведення ПЛР



6. ГЕННА ТЕРАПІЯ

Генна терапія (gene therapy) - це перспективна експериментальна терапія, спрямована на вимикання дефектних генів або відновлення їх нормальної функції при захворюваннях, на перебіг яких впливає елімінація або надання відповідних генів / білків, а інші методи лікування виявляються неефективними.

Концепція генної терапії полягає в тому, що найбільш радикальним способом боротьби з різного роду захворюваннями, викликаними змінами генетичного вмісту клітин, повинна бути обробка, спрямована безпосередньо на виправлення або знищення самої генетичної причини захворювання, а не її наслідків. Причиною може бути мутація в зародковій лінії клітин, яка передається спадково при спадкових захворюваннях, це може бути соматична мутація, яка викликає, наприклад, рак, або це може бути зміна внаслідок появи в клітині чужорідного генетичного матеріалу, наприклад, в результаті вірусної інфекції. Спосіб же боротьби з цими генетичними змінами полягає в штучному уведенні в постраждалу клітку нової генетичної інформації, покликаної виправити ту, з якою пов'язана хвороба.

Стратегії генної терапії:

Мета	Механізм	Приклади
1. Посилення продукції терапевтичного білка	Експресія за допомогою вектора (плазмід, віруси)	Ішемічні захворювання (збільшення кількості судин)

2. Пригнічення продукції патогенного білка	Пригнічення експресії гена, за допомогою антисенсових олігонуклеотидів, коротких інтерферуючих РНК, ДНК рибозимів.	Рестенози, пухлини (пригнічення проліферації)
--	--	---

Використовують два основних підходи при введення нової генетичної інформації в клітини ссавців, що розрізняються природою клітин-мішеней:

- фетальну гемотерапію (етично на людині не використовується), при якій чужорідну ДНК уводять в зиготу або ембріон на ранній стадії розвитку; при цьому очікується, що введений матеріал потрапить в усі клітини реципієнта (і навіть в статеві клітини, забезпечивши тим самим передачу наступному поколінню);

- соматичну генотерапію, при якій генетичний матеріал уводять тільки в соматичні клітини і він не передається статевим клітинам.

Є й третій підхід - активація власних генів організму з метою повного або часткового подолання дії мутантного гена. Яскравий приклад такого підходу - використання гідроксисечовини для активації синтезу гемоглобіну F у хворих із серповидноклітинною анемією і таласемією.

Розрізняють непрямую (клітинну, ex vivo) і пряму (in vivo) генну терапію. При терапії ex vivo специфічні типи клітин виділяють з організму і культивують поза нього, потім у клітини уводять чужорідні терапевтичні гени, відбирають трансформовані клітинні клони і вводять їх тій же людині. Генна терапія in vivo заснована на прямому введенні терапевтичних генів (за допомогою векторних систем) в стінку судини, міокард або скелетні м'язи.

Логічні підходи генної терапії повинні укладатися у введенні в клітину здорового гена і створення умов для його експресії в надії, що його продукт компенсуватиме генетичний дефект. Ідеальним є видалення хворого гена або його зміненої частини і заміна його, або цієї частини, здоровим. Це можна зробити за допомогою таргетингу (**таргетинг** це цілеспрямована зміна певних генів (target-мішень) за рахунок гомологічної рекомбінації послідовностей, що знаходяться в хромосомі, з штучно введеними в клітину послідовностями ДНК). Такий підхід називається *генетичною корекцією*. На даний момент здійснюється не націлене введення генів. Хворий ген продовжує існувати, але вводять додатковий здоровий ген, який збільшує кількість відсутнього клітині або організму продукту. Цей спосіб називається генною терапією, яка поповнює.

Крім вибору потенційно терапевтичних генів успіх лікування залежить від характеристик спеціальних генних носіїв (векторних систем / векторів) і від засобів механічної доставки векторів до клітин-мішеней. В ідеалі вектори повинні забезпечувати ефективно та безпечно проникнення і експресію терапевтичних генів в клітинах-мішенях, а засоби механічної доставки векторів до цих клітин - легко і нетравматично поміщати вектор у потрібну ділянку, наприклад, судини, уникаючи попадання генетичного

матеріалу в системний кровотік. Обмежена ємність векторів ускладнює доставку великих генів.

Векторні системи бувають **вірусними** і **невірусні**. Для клінічного застосування вони повинні володіти певними якостями, і слід зазначити, що універсальних векторів не існує. Вибір вектора і методу його доставки визначається конкретним завданням генної терапії (в які клітини потрібно ввести терапевтичний ген, як довго потрібна його експресія і в якій кількості тощо). Більшість доступних на сьогодні векторів для терапії *in vivo* забезпечує тимчасову експресію перенесених генів у клітині, тому й кращі результати генної терапії отримані при захворюваннях і станах, що не вимагають довічної активності терапевтичних генів (наприклад, при рестенозі просвіту артерій, що розвиваються після балонної ангіопластики, стентування або атеректомії).

Невірусні вектори представлені або плазмідною ДНК, або комплексами ДНК з ліпосомами, аденовірусними білками, трансферином, полілізином тощо. Плазмідна ДНК не вбудовується в геном хазяїна і забезпечує лише 2-4 тижні експресії гена. Крім того, трансфекція клітин плазмідної ДНК *in vivo* становить всього 0,1%, і тому метод використовують при необхідності деякий час секретувати білок, здатний за паракринним механізмом діяти на інші клітини. Якщо ж потрібна тривала експресія білка, активного тільки в тій клітині, де він синтезований, використовують модифікації вектора.

Вірусні вектори представлені послабленими або модифікованими ретровірусами, аденовірусами, аденоасоційованими вірусами, вірусом герпесу 1-го типу, тощо. Ретровірусні вектори застосовуються тільки для судинної генної терапії *ex vivo*. Аденовірусні векторні системи в сотні і тисячі разів ефективніше, ніж плазмідні і ретровірусні, але забезпечують лише короточасну експресію уведених генів (до 4 тижнів), а повторні введення чреваті розвитком запальних та імунних реакцій, особливо в разі 1-го покоління аденовірусів. Розвиток імунної відповіді на вірусні білки може супроводжуватися елімінацією внесених терапевтичних генів. Лентивіруси (ВІЛ) також здатні до трансфекції клітин, що не діляться, але вони потенційно небезпечні для людини. Ефективне й перенесення генів за допомогою гемаглютинуючих вірусів, але застосування цього вектора обмежене неспецифічним зв'язуванням вірусів з еритроцитами. Перспективне використання аденоасоційованих вірусів - непатогенних, здатних до трансфекції клітин, які не діляться, і забезпеченню тривалої експресії уведених терапевтичних генів.

Історія розвитку генної терапії

80-і роки

Лікування хвороб шляхом введення в тканини або в клітини пацієнта смислових послідовностей ДНК.

Первинні цілі: виправлення дефектів у гені при моногенних спадкових захворюваннях.

Методи: заміна мутантного гена чи його мутованого фрагмента на нормальний.

Рівень корекції дефекту: соматичні клітини або зародкові/статеві клітини

Складнощі у реалізації первісних уявлень:

- непередбачувані наслідки для генофонду людства, пов'язані з маніпуляціями на рівні статевих і зародкових клітин.
- виправляти дефект гена складніше, простіше увести в організм повноцінно працюючий ген (кДНК).

- розроблена методологія підходить не тільки для моногенних спадкових захворювань, але й для широко розповсюджених захворювань багатofакторної природи (злоякісні пухлини, серцево-судинні захворювання, ендокринні хвороби, тощо)

90-і роки

- лікування спадкових, онкологічних, інфекційних, серцево-судинних та інших захворювань шляхом уведення генів у клітини пацієнтів з метою спрямованої зміни генних дефектів або додання клітинам нових функцій.
- уведення послідовностей ДНК в клітини-мішені з метою корекції спадкової патології, що виникла внаслідок генетичного дефекту, або для додання клітинам нових функцій, що сприяють усуненню патологічних процесів.
- ген розглядається як лікарський препарат

2000-і роки

Лікування хвороб шляхом уведення ДНК- або РНК-специфічних генів в клітини організму

Приклад генотерапії сімейної гіперхолестеринемії (СГХ)

Процедура

1. Гепатоектомія: 250 г печінки (15%)
2. Колагеназа для звільнення клітин
3. 2 млрд клітин (98% живих)
3. Культивування 2 доби
4. Трансдукція LDLR-ретровірусним вектором 12-18 годин (20% ефективність)
5. Нарощування гепатоцитів в культурі (3 доби)
6. Реінфузія модифікованих гепатоцитів в печінку через ворітну вену

Результат:

Біопсія печінки через 4 місяці: 1 з 1000-10000 гепатоцитів експресують нормальний рецептор

