

Гендік инженерияның мәселелері мен міндеттері. Хромосомалық және клеткалық инженерия

Генетикалық инженерия деп *in vitro* жағдайында функциялық пәрменді генетикалық құрылымдарды (рекомбинантты ДНҚ-ны) құрастыруды және оларды тірі клеткаларға енгізуді айтады. «Генетикалық инженерия» және «ген инженериясы» терминдері синоним ретінде қаралғанмен, олардың мағынасы бірдей емес: генетикалық инженерия — генетикамен байланысқан, ал ген инженериясы — тек генге ғана қатысы бар.

Рекомбинантты ДНҚ (рДНҚ) дегеніміз әр текті ДНҚ-лардан құралған (табиғи немесе синтетикалық ДНҚ фрагменттерін жалғастыру арқылы) және клеткаларда репликациялана алатын генетикалық құрылымды түсінеді.

Ген инженериясы мынадай кезеңдерден тұрады: 1) генді (ДНҚ фрагментін) алу; 2) рекомбинантты ДНҚ молекуласын құрастыру; 3) реципиент клеткасына рекомбинантты ДНҚ молекуласын енгізу; 4) қажет рекомбинантты ДНҚ молекулалары бар клондарды (бактериялық клеткаларды) ортадан табу.

Генді алудың үш әдісі бар: табиғи генді тікелей бөлу (сирек мүмкіндік), химиялық және ферменттік синтез. Табиғи генетикалық материалдан — ДНҚ-дан арнайы ферменттердің (рестрикциялық эндонуклеазалардың) көмегімен қажет ген «кесіліп» алынады. Бұл әдістің елеулі кемшіліктері бар. Біріншіден, ДНҚ-дан қажет генді танып, кесе алатын ферментті таңдап алу қиын. Фермент генді әрқашанда нақты шекарасында емес әр қилы үзеді: не гоннің екі жағынан артық нуклеотидтерді үзуі, не түгел үзбеуі мүмкін, мұндай ДНҚ фрагменттерінің қызметі жеткіліксіз, сондықтан оларды пайдалану мүмкін болмайды. Екіншіден, эукариоттық организм геномының экзон-интрондық құрылысы, олардың гендерін бактерияларға енгізгенде функциялық тұрғыдан қиындық туғызады, өйткені бактериялық клеткада сплайсинг процесі (интрондардың кесілуі) өтпейді. Үшіншіден, егер ген барлық ДНҚ-ның аз ғана бөлігін құраса, онда оны бөлу мен анықтауда елеулі қиындықтар пайда болады. Сондықтан бұл әдіс негізінен генетикалық эксперименттер талабына сәйкес вирус пен бактериялардың генін бөлуде қолданылады.

Генді синтездеудің химиялық әдісі. Бұл әдістер белоктың немесе полипептидтің бірінші құрылымы (амин қышқылдар қатары) белгілі болса, оның генінің нуклеотидтер қатары химиялық жолмен синтезделеді.

Берілген нуклеотидтер тізбегі бойынша ДНҚ синтездеу әдісін 1969 жылы, ген инженериясының дәуірі басталмаған кезде-ақ, Г. Корана ұсынған болатын. Ашытқы тРНҚ-ның гені осылай синтезделді. Бұл ген 77 н. ж. құралған. Алдымен, ұзындығы 5—12 нуклеотидтерден тұратын ДНҚ-ның қысқа фрагменттері синтезделді, онан соң олар арнайы ферменттің (лигаза) әсерімен бір-бірімен қосылды. Алайда, алғаш синтезделген бұл генді ішек таяқшасының клеткасына енгізген кезде жұмыс істей алмады, өйткені онда реттеуші элементтер — промотор және терминация бөліктері жоқ болатын. Кейін, 1976 ж. Г. Корана қызметкерлерімен тирозиннің тРНҚ-сының генін синтездей алды. Геннің ұзындығы 126 н. ж. тең болды, оған 52 н. ж. құралған промотор, 21 н. ж.— терминатор және ұштарына тетрануклеотидтер (ААТТ және ТТАА) жалғанды. Нәтижесінде, осы генді бактериофаг арқылы *E. Coli* клеткасына енгізгенде олар өз функциясын керсете алды.

Генді синтездеудің ферменттік (энзимдік) әдісі. Генді синтездеудің үшінші әдісі кеңінен таралған және кейін рекомбинантты ДНҚ күйінде бір, кейде көп клеткалы организмдерде

көбейетін гендердің негізгі шығу көзі болып саналады. Оның мәні ферменттік синтез арқылы генді алудан тұрады және төмендегіге саяды. Ең алдымен, клеткалардан (мұнда, қажет геннің активтілігі жоғары болуы керек) информациялық (матрицалық) РНҚ (иРНҚ) молекулаларын бөліп алады, олардың арасында ген коделейтін иРНҚ бар, міне осы иРНҚ-ны бөлу қажет. Бұдан кейін кері транскриптаза (ревертаза) ферментінің көмегімен бөлінген иРНҚ-да комплементарлы ДНҚ (кДНҚ) синтезделеді. Кері транскрипция процесінде матрицалық иРНҚ-да кДНҚ-ның синтезі басталуы үшін иРНҚ-ның 3'— ұшына комплементарлы «ашытқы» - олигонуклеотид (қысқа тізбек) қажет. Жаңа кДНҚ тізбегі синтезделуі үшін тағы Mg^{2+} иондары мен дезоксинуклеозидтрифосфаттар керек.

Жаңа кДНҚ синтезделіп біткеннен кейін, оны тазалап, ДНҚ-ның екінші тізбегін синтездеу үшін матрица ретінде пайдаланады. Ол үшін ортаға ревертазаны немесе ДНҚ-полимеразаны (бактериялардан алынған) қосады. ДНҚ-ның екінші тізбегінің синтезі басталуы үшін олигонуклеотид (ДНҚ-ның 3'—ұшына комплементарлы) керек, әйтпесе кДНҚ-ның 3'— ұшы белгісіз себептермен шпилькалы құрылым түзеді, осы құрылым екінші ДНҚ-ның синтезін инициациялай алады. ДНҚ-ның екінші тізбегі синтезделіп болғаннан кейін, оның алғашқы кДНҚ-мен қосылған бөлігі (шпилькалы) нуклеаза S1 ферментінің әсері арқылы ажырайды, нәтижесінде қос тізбекті ген алынады, оны қос тізбекті комплементарлы ДНҚ (кДНҚ) деп атайды. РНҚ жіпшелері сілтінің әсерімен гидролизденеді, ал олигонуклеотидтер аталған нуклеазаның әсерімен ыдырайды.

Кері транскриптаза ферменті арқылы синтезделген гендерді бактерия клеткасына енгізбестен бұрын, оларға реттеуші элементтер жалғайды. Прокариоттарда сплайсинг өтпейтінін ескерсек, онда генді ферменттік жолмен синтездеу үшін матрица ретінде иРНҚ-ны емес, жетілген иРНҚ пайдалану керек.

Хромосомалық инженерияны эукариоттық организмде қарастыруға болады, өйткені прокариоттарда "хромосома" және "геном" түсініктемелері біртекті қаралады. Жалпы хромосомаларды және олардың фрагменттерін биологиялық объектілерді өзгерту әдісі ретінде тасымалдау әзірше болмашы рөл атқарады. Дегенмен мұндай әдістің іргелі мағынасы зор және болашақта елеулі рөл атқаруы мүмкін. Хромосомаларды басқа клеткаға (реципиенттік) трансформациялау үшін алдымен оларды клеткадан (донорлық) бөліп алу қажет. Ол үшін клетка бөлінуін колхициннің көмегімен метафаза стадиясында тоқтатады. Онан соң клеткаларды гипотонизациялайды. Хромосомалардың таза бөлігін дифференциальды центрифугалау арқылы бөледі. Бүтін хромосома немесе оның бөліктері реципиенттік клеткаға пиноцитоз жолымен енеді. Клеткаға енген интактлі хромосомалар өздерінің құрылымын бірнеше ұрпақ деңгейінде сақтап тіпті репликациялана алады. Нәтижесінде мұндай хромосомалардың гендері полипептид синтезін іске асыра алады. Жалпы клеткаға енген хромосомалар ақырында /лизосомалық ферменттердің әсерінен жеке бөліктерге ыдырайды.

Хромосомалық инженерияның әдістері жануарлар хромосомаларының генетикалық картасын құрастыруға үлкен мүмкіндіктер береді. Геном дейгейіндегі генетикалық инженерияның ең соңғы жетістігі - мал клонын алу.

Клетка инженериясының негізін *сома клеткалардың гибридизациясы* - қосылуы құрайды. Мұндай қосылудың нәтижесінде гибриді клеткалар типі түзіледі, олардың ядросында бастапқы клеткалар хромосомаларының қосындысына тең хромосомалар саны болады. Егер культураға кейбір заттарды, мысалы полиэтиленгликоль немесе инактивацияланған вирустарды қосса, онда гибрида клеткалардың тузілуі өте жоғары жиілікпен өтеді. Осындай мақсатпен Сендай вирусы өте жиі қолданылады. Олардың клетка рецепторларымен байланыса алатын бірнеше ерекше бөліктер бар, сондықтан бір мезгілде екі клеткамен байланыса алады. Вирустың мөлшері өте ұсақ

болғандықтан клеткалар өте тығыз жаншылады да, бір-бірімен қосылып, жаңа гибридік клетка бірігіп кетеді. Мұндай қосылуда дикарион - екі ядролы клетка түзіледі. Онан соң екі ядроның хромосомалары бірігіп, синкарж түзілуі мүмкін. Бастапқы клеткалар тек синкарион түзеп қан қоймай, бірнеше ұрпақ көлемінде митоздық бөлінуге қабілеті болуы керек.

Қазіргі кезде әр түрлі сүтқоректілердің, тіпті систематикалық тұрғыдан бір-бірінен өте алыс түрлердің клеткаларын гибридазациялау әдістері тәжірибелерде ойдағыдай қолдану алл: Мысалы, адам х тышқан, адам х ірі қара, қоян х тауық, ірі қара кара күзен, адам х тауық, ірі қара х атжалман және т.с гибридік клеткаларды *in vitro* жағдайында өсіруге болады. Жаңадан тузілген гибридік клеткаларда белгісіз себептер митоздық бөлінудің алғашқы кезендерінде бір түрдің хромосомаларының жоғалуы байқалады. Әдетте, 30 бөлінуден кейін мұнда клеткаларда тышқанның барлық хромосомалары және адамның орта есеппен жеті хромосомасы сақталады. Ірі қара х атжалман шошқада х тышқанн гибридік клеткаларында алғашқы керсетііге түрлердің хромосомаларының жоғалуы жиі байқалады. Бір түрдік хромосомаларының гибридік клеткадан жоғалу өзгергіштігі хромосомалардың генетикалық картасын құрастыруға мүмкіндік береді. Егер гибридік клетка өсетін ортаға енгізген өнімге байланысты гибридік клеткада қайсыбір хромосома сақталса, онда өшмнің гені осы хромосомада орналасқан деп есептелінеді. Қазіргі кезде сома клеткаларды гибридазациялау әдісінің көмегімен адамның 2000-дай генінің хромосомалардағы орны табылды.

Клетка инженериясының ең перспективалы бағыты гибридомалар алу. *Гибридома* дегеніміз лимфоцит және миелома (рак) клеткаларының қосылуы нәтижесінде түзілген гибридік клетка. Организмнің иммундық жүйесінің негізін құрайтын лимфоциттер (Т және В) арнайы қоректік орталарда көбейіп, өздері организмде синтездейтін иммуноглобулиндерді түзей алады. Дегенмен, олардың өсу уаидатысы тым жетімсіз. Осы мәселені 1976 ж. Д. Келлер және Ц.Милстейн (ГФР) гибридомалық клетка алу әдісі арқылы шеше алды. Олар миеломаны алдын ала антизатпен егілген көкбауыр клеткаларымен (лимфоциттермен) қосып, гибридік Сома клеткаларын гибридазациялау әдісі арқылы моноклонды антизаттар алу мынадай этаптардан тұрады: иммунизациялау, клеткаларды біріктіруге дайындау және оларды біріктіру, қажет антизатты синтездейтін клондарды сұрыптау, гибридомалық клеткалардың жеткілікті мөлшерін көбейту, антизаттар бар культура сұйықтығын алу және антизаттарды бөлу.

Моноклонды антизаттар әр түрлі ауруларға (рак, гепатит, оба, иммунотапшылық синдромы т.б.) диагноз қоюда кең практикалық қолдану алды. Мысалы, ірі қараның р24 лейкемия вирусы белогына қарсы моноклонды антизаттар синтездейтін клеткалар алынды. Организмнің иммундық жүйесі Т-лимфоциттерге де байланысты. Мысалы, олардың цитотоксинді (цтТ-лимфоцит) популяциясы вирус және рак клеткаларын жойып жіберуге қабілетті. Осындай лимфоцитті миелома клеткасымен біріктіру арқылы алынған гибридомаларды рак ауруына қарсы қолданудың маңызы зор.