

Молекулярная биотехнология
Биоинженерия

Якупов Т.Р.

Молекулярная биотехнология
Биоинженерия

Казань 2018

УДК 619:616.98:579.873.21:636.22.28
ББК 28672я73

Печатается по решению Ученого совета факультета биотехнологии и стандартизации ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ»

Рецензенты: Юсупова Г.Р. - доктор биологических наук, лауреат Государственной премии РТ, профессор кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО КГАВМ.

Вафин Р.Р. - доктор биологических наук, профессор РАН, главный научный сотрудник ФГБНУ ТатНИИСХ.

Якупов Т.Р. Молекулярная биотехнология. Биоинженерия: учебное пособие /Т.Р.Якупов. – Казань: ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, 2018. – 157 с.

Учебное пособие предназначается для студентов по направлениям подготовки – 36.05.01-«Ветеринария» и 36.03.02- «Зоотехния», для магистрантов и аспирантов по направлению подготовки 06.06.01-Биологические науки. Состоит из двух глав, где изложены основы генной и клеточной инженерии: методы изучения генома, конструирование рекомбинантной ДНК, технологии трансгенеза, клонирования и др.

© Т.Р.Якупов, 2018

© ФГБОУ ВО Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, 2018.

Введение

Термин "биотехнология" впервые был применен в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки для описания процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. По определению Эреки, биотехнология – это "все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты".

В настоящее время «Биотехнологию», в целом, определяют как науку о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) растений, животных и микроорганизмов в целях интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения. Однако, среди ученых нет единого и точного определения понятия «биотехнология». Объяснить это можно тем, что современная «биотехнология» - не отдельная наука с конкретными целями, задачами и предметом изучения, а целая область знаний, объединяющая множество наук – биологических, точных и др.

В историческом смысле биотехнология возникла тогда, когда дрожжи были впервые использованы при производстве пива, а бактерии – для получения йогурта. А в целом достижениями биотехнологии люди пользовались с древних времен, даже не зная о существовании микроорганизмов. Современный мир переживает глобальный биотехнологический бум. Биотехнология все больше и больше становится системообразующим, ведущим фактором развития экономики отдельных государств и мировой эконо-

мики в целом. Основная причина быстрого развития биотехнологии – это ускоренное развитие человечества. Например, за последние 200 лет количество людей возросло в более чем 6 раз, потребление энергии – 40 раз.

Объектами биотехнологии служат многочисленные представители групп живых организмов — микроорганизмы (вирусы, бактерии, дрожжи и др.), растения, животные, а также изолированные из них клетки и субклеточные структуры (органеллы). Биотехнология базируется на протекающих в живых системах как физико-химических, так и физиолого-биохимических процессах, в результате которых осуществляются выделение энергии, синтез и расщепление продуктов метаболизма, формирование химических и структурных компонентов клетки.

В целях конкретизации предметов изучения и задач биотехнологии, для более научного восприятия биотехнологических процессов выделяют «молекулярную биотехнологию», которую можно представить как науку, развившуюся из молекулярной биологии - изучения явлений жизни на молекулярном уровне.

Молекулярная биотехнология как наука возникла в начале сороковых годов и получила ускоренное развитие с 1953 года, после открытия Джеймса Уотсона и Френсиса Крика о химической структуре и пространственной организации двойной спирали ДНК.

В 1953 году Уотсон и Крик, на основании имеющихся к тому времени данных, сформулировали теорию о структуре ДНК – о том, что ДНК представляет собой полимер из нуклеотидов в виде двойной спирали и является носителем генетической информации. Это было выдающимся дости-

жением молекулярной биологии – открытие новой эры в биологии. Последующие исследования полностью подтвердили правильность этой теории.

Разработка методов исследования нуклеиновых кислот позволила осуществлять секвенирование ДНК, выдающимся достижением чего является то, что в 2000 году были доложены предварительные, а в 2003 году – окончательные результаты расшифровки генома человека.

В 1973 году разработкой Стэнли Коэном и Гербертом Боером технологии переноса функциональной единицы наследственности, гена, из одного организма в другой явилась новым этапом развития молекулярной биотехнологии. На этой основе разрабатывались новые методы и технологии, с помощью которых можно было быстро идентифицировать, выделять и использовать гены. Полученные результаты внесли значительный вклад в развитие всех биологических дисциплин – биологии развития, молекулярной эволюции, клеточной биологии, генетики человека и животных, биотехнологии.

Условно молекулярную биотехнологию можно разделить на 4 основные и тесно взаимосвязанные между собой разделы (или направления):

1. Генная инженерия
2. Клеточная инженерия
3. Инженерная энзимология
4. Техническая или производственная микробиология.

Каждая из этих направлений представляют собой обширную область знаний со своими целями и задачами.

Генетическая инженерия - совокупность методов, позволяющих искусственно переносить генетическую информацию из одного организма в другой с помощью специально созданных генетических конструкций. Одной из главных задач генной инженерии является получение организмов с желаемыми свойствами. Основным подходом - конструирование *in vitro* (вне организма) рекомбинантных молекул ДНК (искусственно скомбинированных из фрагментов) с заданными наследственными свойствами, поэтому генную инженерию также называют технологией рекомбинантных ДНК.

Клеточная инженерия - совокупность методов, используемых для конструирования новых клеток. Включает культивирование и клонирование клеток на специально подобранных средах, гибридизацию клеток, пересадку клеточных ядер и другие микрохирургические операции по «разборке» и «сборке» (реконструкции) жизнеспособных клеток из отдельных фрагментов.

Преимущество клеточной инженерии в том, что она позволяет экспериментировать с клетками, а не с целыми организмами. Последнее гораздо сложнее, а иногда и невозможно, особенно в случае млекопитающих животных и человека или при получении отдалённых гибридов. Методы клеточной инженерии в медицине, сельском хозяйстве или биотехнологии часто применяют в сочетании с генной инженерией.

Генная инженерия и клеточная инженерия составляют основу молекулярной биотехнологии. Объединив их в одно целое, в настоящее время выделяют отдельный раздел молекулярной биотехнологии - биоинженерию.

Инженерная энзимология – область биотехнологической науки, к которой относят систему методов получения, очистки, стабилизации и применения ферментов. Основной задачей инженерной энзимологии является конструирование биоорганических катализаторов с заданными свойствами и разработка на их основе различных эффективных и экологически чистых биотехнологических процессов.

Инженерная энзимология, разрабатывает и осуществляет промышленные методы получения химических веществ и продуктов, основанные на использовании в качестве катализаторов химических реакций ферментов. Широкое применение ферментов в промышленности стало возможным благодаря использованию иммобилизованных ферментов.

Техническая или производственная микробиология - раздел биотехнологии, разрабатывающий способы культивации полезных микроорганизмов в промышленных масштабах.

Техническая микробиология изучает микроорганизмы, используемые в производственных процессах с целью получения различных практически важных веществ: пищевых продуктов, лекарственных препаратов биологически активных веществ и др. Современная техническая микробиология вносит большой вклад в решение таких глобальных социальных проблем, как охрана здоровья, обеспечение человека продовольствием, охрана природы и энергообеспечение.

ГЛАВА 1

Генетическая инженерия

1. Краткая история. Достижения

Генетическая или генная инженерия сегодня достигла довольно высокого уровня развития и остается наиболее бурно развивающимся направлением молекулярной биотехнологии. Благодаря генной инженерии человечество получило шанс разрешения многих вопросов и проблем в области медицины, сельского хозяйства и ряда иных областей.

С развитием генной инженерии ученые получили возможность синтезировать, выделять, комбинировать и перемещать гены и любые другие фрагменты ДНК.

Генная инженерия внесла революционный вклад в развитие многих биологических дисциплин, таких как, молекулярная биология, микробиология, вирусология, медицинская генетика, генетика человека и др. Появилась ранее недоступная возможность изучения молекулярной организации геномов (в том числе высших эукариот), что привело к возникновению геномики — раздела генетики, изучающего структурную организацию и функционирование геномов.

Одним из последних сверх достижений генной инженерии является создание искусственной клетки, о чем доложил 2010 году Крейг Вентер.

Работы Крейга Вентера принадлежат к новой области «синтетической биологии», которая объединяет в себе и химию, и медицину, и геномику, и ряд других традиционных научных дисциплин, главной целью, которой является

создание целого генома и перепрограммирование организмов.

Первый этап развития генной инженерии - попытка расшифровки генома живого организма. Ученые впервые пробовали понять, за какие конкретно функции в организме живого существа отвечает тот или иной отдельно взятый ген. В 1980 году «за фундаментальные исследования биохимии нуклеиновых кислот, особенно рекомбинантной ДНК» Пол Берг, Уолтер Гилберт и Фредерик Сенгер были удостоены Нобелевской премии в области химии. В целом, они получили ее за удачную попытку расшифровки генетической информации.

На сегодняшний день с помощью генетической инженерии созданы линии животных, устойчивых к вирусным заболеваниям, а также породы животных с полезными для человека признаками.

Генная инженерия открыла путь для производства продуктов белковой природы путем введения в клетки микроорганизмов, искусственно синтезированных генов, где они могут экспрессироваться (встраиваться) в состав гибридных молекул. Первой удачной попыткой такого рода стала работа К. Итакуры и Г. Бойера с соавторами (1977г.) по экспрессии в *E. coli* химически синтезированного гена, кодирующего гормон млекопитающих - соматостатин.

Метод химического синтеза генов обеспечил возможность получения штаммов бактерий - продуцентов инсулина человека, важного лечебного препарата для больных диабетом. Таким способом получены и клонированы гены, кодирующие глобины человека, животных и птиц, белок

хрусталика глаза, яичный белок, фиброин шелка, продуцируемый тутовым шелкопрядом, и др. Этот же принцип был применен для получения, клонирования и экспрессии генов интерферона человека в бактериях.

Величайшим достижением генной инженерии можно назвать то, что в 2003 году было объявлено об успешном выполнении международной научной программы «Геном человека».

Программа «Геном человека», международная программа, конечной целью которой являлось определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) всей геномной ДНК человека, а также идентификация генов и их локализации в геноме (картирование). Общебиологическим значением исследований в рамках Проекта является, то что исследования способствовали секвенированию геномов огромного числа других организмов. Без геномного проекта эти данные были бы получены гораздо позже и в гораздо меньшем объеме.

Сейчас, даже трудно предсказать все возможности, которые будут реализованы в ближайшие несколько десятков лет. Самые большие надежды возлагаются на возможность применения результатов секвенирования генома человека для лечения генетических заболеваний. К настоящему времени в мире идентифицировано множество генов, ответственных за многие болезни человека, в том числе и такие серьезные, как болезнь Альцгеймера, муковисцидоз, мышечная дистрофия Дюшенна, хорея Гентингтона, наследственный рак молочной железы и яичников. Структуры этих генов полностью расшифрованы, а сами они клонированы.

Генетическая инженерия имеет яркую историю, благодаря, прежде всего, открытиям в области исследований нуклеиновых кислот:

1869г. - Ф. Мишер - выделение ДНК из ядер клеток гноя;

1940г. - Браун и Тодд – расшифровка принципов химического строения полинуклеотидной цепи;

1950г. - Э. Чаргафф – сформулировал закономерностей нуклеотидных отношений (правило Чаргаффа);

1953г. - Д. Уотсон, Ф. Крик - сконструирована модель двойной спирали ДНК на основании результатов рентгеноструктурного анализа ДНК;

1956г. - Э. Волкин, Астрахани и Херши - открытие и-РНК;

1957г. - А. Корнберг - синтез ДНК *in vitro*;

1966г. - М. Ниренберг, Г. Корана - расшифрован генетический код;

1967г. - М. Геллерт - открыта ДНК-лигаза;

1968г. - М. Мезельсон, Е. Юань - выделена первая рестриктаза;

1972-1973г.г. - Г. Бойер, С. Коэн, П. Берг - разработана технология клонирования ДНК;

1975-1977г.г. - Ф. Сэнгер, Р. Баррел, А. Максам, В. Гилберт - разработаны методы быстрого определения нуклеотидной последовательности;

1981-1982г.г. - Р. Пальмитер, Р. Бринстер, А. Спрэдлинг - получена трансгенная мышь.

1998г. – создана полная генетическая карта животного (круглого червя);

2003г. – полностью расшифрован геном человека;

2010г. - создана первая синтетическая клетка, которая работает на основе синтетического генома.

2. ДНК – носитель генетической информации

Нуклеиновые кислоты были впервые открыты в 1869 г. Фридрихом Мишером, когда из лейкоцитов крови человека выделил «нуклеин» - вещество с кислотными свойствами. К концу XIX века они были получены Р. Альтманом (1889) в чистом виде из клеток тканей животных и дрожжей. Термин «нуклеиновые кислоты» был предложен в 1889 году А. Косселем, а роль нуклеиновых кислот как носителей наследственности была установлена сравнительно недавно, и был сделан Гриффисом в 1928 году, который открыл явление бактериальной трансформации. В опытах Гриффиса было показано, что пневмококки бескапсульной формы (R-формы) приобретают вирулентность, если их смешивать с убитыми нагреванием вирулентными (S-формами) штаммами пневмококков.

Нуклеиновая кислота – высокомолекулярное соединение или биологический полимер, построенный из мононуклеотидов.

Различают два вида нуклеиновых кислот:

- 1) ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;
- 2) РНК - рибонуклеиновая кислота.

Биологическая функция нуклеиновых кислот заключается в хранении, передаче и реализации генетической информации, обеспечивая тем самым жизнедеятельность и индивидуальность живого организма.

Основные отличия между ДНК и РНК

1. ДНК имеет двухцепочечную структуру, РНК - одноцепочечна. ДНК локализована в основном в ядре клетки,

РНК – в цитоплазме. РНК бывает 3-х основных видов: иРНК, тРНК и рРНК.

2. Отличие в нуклеотидном составе: ДНК построена из АМФ, ГМФ, ЦМФ, ТМФ; РНК – из АМФ, ГМФ, ЦМФ и УМФ. Таким образом, в ДНК никогда не встречается УМФ, а в РНК – ТМФ.

3. Отличие в строении нуклеотидов: в нуклеотидах ДНК вторым, углеводистым компонентом является дезоксирибоза, в нуклеотидах РНК – рибоза.

Огромную роль в разгадке особенностей строения, в расшифровке структуры молекулы ДНК сыграло учение американского биохимика Эрвина Чаргаффа. Основные положения его учения известны как правила Чаргаффа.

Структурными единицами нуклеиновых кислот являются – мононуклеотиды. Следовательно, нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, где мононуклеотиды связываются между собой сложноэфирной связью. Ковалентный остов молекулы нуклеиновой кислоты составляют монотонно чередующиеся остатки фосфорной кислоты и пентозы, а азотистые основания как боковые группы стоят на равных расстояниях друг от друга связанные с пентозами.

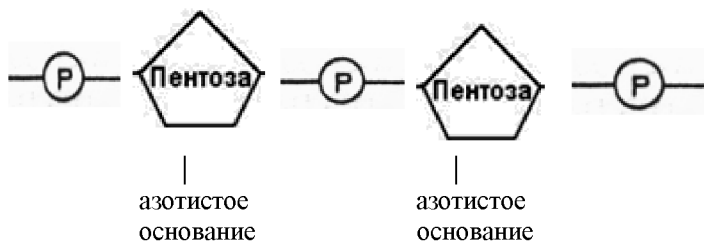


Рис. 1. Схема строения цепи нуклеиновой кислоты.

Остаток фосфорной кислоты с одного конца цепи связывается с 5, с другого – с 3 углеродом пентозы. В зависимости от этого различают -5' конец и -3' конец полинуклеотидной цепи. Как правило, с 5' конца начинается синтез полинуклеотидной цепи в процессах репликации, транскрипции, а также репарации, т.е. 5' конец можно назвать началом цепи нуклеиновых кислот.

Две цепи ДНК всегда обращены друг другу своими азотистыми основаниями. В такой структуре оказываются точно пригнанными друг другу только определенные пары азотистых оснований. Таковыми являются А-Т и Г-Ц пары. Они дополняют друг друга, они связаны между собой водородными связями, они – комплементарны. В этом суть принципа комплементарности.

Принцип комплементарности азотистых оснований является основным «биологическим законом» обеспечивающим хранение, передачу и реализацию генетической информации, обуславливая тем самым жизнедеятельность и индивидуальность живых организмов.

Рибонуклеиновые кислоты (РНК) принимают участие в процессе реализации наследственной информации - в биосинтезе белков. Различают несколько видов РНК - информационную, рибосомальную и транспортную и др. Рибонуклеиновые кислоты также могут исполнять роль носителя генетической информации, например, у РНК-содержащих вирусов.

Структурная организация нуклеиновых кислот

Различают первичную, вторичную и третичную структуру ДНК.

Первичная структура ДНК - последовательность нуклеотидов, образуется благодаря сложноэфирной связи, возникающей между остатком фосфорной кислоты у одного мононуклеотида и с 3 углеродом дезоксирибозы другого мононуклеотида.

Вторичная структура ДНК - спирализация полинуклеотидной цепи, вернее двух цепей образуя двойную спираль. Выяснение вторичной структуры ДНК - это одно из крупнейших открытий в биологии, так как при этом был раскрыт молекулярный механизм передачи генетической информации в ряду поколений. Модель вторичной структуры ДНК была предложена в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком на основании данных рентгеноструктурного анализа. При этом было также установлено, что ДНК склонна к полиморфизму и в различных условиях существует в виде по-разному упорядоченных волокнисто-кристаллических структур. Их существует более десятка, но наиболее распространены и изучены методом рентгеноструктурного анализа только четыре: А-, В-, С- и Т-формы. Все они являются правозакрученными спиралями и различаются друг от друга шагом спирали, числом оснований на виток и рядом физических констант. Существование такого количества вторичных структур ДНК обусловлено тем, что в каждый момент своего существования ДНК образует наиболее удобные для выполняемых ею функций конфигурации:

- А-форма молекул наиболее удобна для процесса транскрипции;
- В-форма – для репликационных процессов;
- С-форма – для образования комплексов между молекулой ДНК и белками хроматина.

В 70-х годах XX века были получены данные о существовании двух новых конформаций вторичной структуры ДНК – Z-формы и SBS-конформации. Z-форма представлена левозакрученными полинуклеотидными цепями с зигзагообразным расположением фосфатных групп. В Z-форме ДНК участвует в различных метаболических процессах. SBS-конформация ДНК характеризуется отсутствием взаимозакрученных полинуклеотидных цепей в биспиральную молекулу. Они располагаются бок о бок, очень легко распариваются, расходятся, что играет большую роль при биосинтезе ДНК.

Третичной структурой ДНК можно представить организацию её молекулы в хроматиновые волокна в ядрах клеток тканей организма. Молекула ДНК является очень длинной, поэтому в ядре плотно «упакована» путем сверхспирализации с участием белков основного характера. ДНК клетки в основном находится в составе хромосом и лишь небольшая часть ее находится в митохондриях. Суммарный материал хромосом – *хроматин*, содержит ДНК, гистоны, негистоновые белки и небольшое количество РНК.

Основой генетического аппарата эукариот являются хромосомы, в основе которых лежит линейная двуспиральная правозакрученная молекула ДНК, связанная со специфическими белками-гистонами. Известно 5 типов гистонов: H1, H2A, H2B, H3, H4. В ядрах эритроцитов птиц H1 частично замещается на H5. У дрожжей отсутствует H1, а у некоторых видов хламидомонад гистоны вообще не обнаружены. Гистоны H2 – H4 эволюционно устойчивы: из 102 аминокислот H4 наблюдаются различия

лишь по 1-2 аминокислотам у высших растений, рыб и млекопитающих. Гистон H1 весьма вариабелен, и даже в тканях одного организма встречаются 3 – 6 вариантов этого белка.

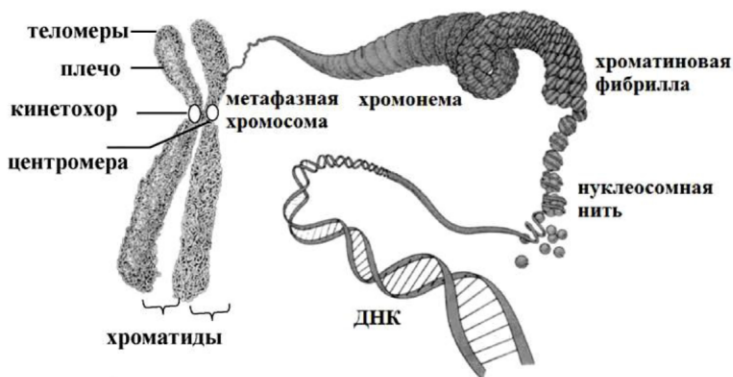


Рис. 2. Схема упаковки ДНК в хромосому

Гистоны H2 – H4 образуют белковое ядро из 8 полипептидов (каждый гистон повторяется 2 раза). Вокруг этого ядра укладывается участок цепи ДНК длиной 140 п.н., образующий 1,75 витка по периферии. Такая структура называется *нуклеосома*, являющейся элементарной единицей упаковки хроматина. Отдельные нуклеосомы – это дисковидные частицы диаметром около 10 нм. Закручивание ДНК вокруг нуклеосом уменьшает ее длину в семь раз. Участки ДНК между нуклеосомами длиной 10 - 15 п.н. называются связывающими (линкерами). Структура линкеров стабилизируется с помощью гистона H1.

Последовательность нуклеосом, в свою очередь, образует еще одну спираль диаметром 20 - 25 нм (соленоид), или последовательность нуклеосомных группировок –

нуклеомеров. Эти высшие структуры образуют петли или домены. Конденсация ДНК в структуре соленоида дополнительно (к нуклеосомному уровню) уменьшает ее длину в шесть раз.

В интерфазных хромосомах путем еще одного цикла конденсации соленоиды образуют полые трубочки диаметром 200 нм, что уменьшает длину ДНК еще в 18 раз.

Описанная структура хромосом у эукариот обеспечивает их устойчивость. При транскрипции и репликации происходит деспирализация хромосом, что обеспечивает возможность контакта определенных участков ДНК с ДНК-полимеразой или РНК-полимеразой.

В метафазе вследствие дальнейшей конденсации возникает большая образованная дезокси-нуклеопротеидом спираль диаметром около 600 нм. В результате строго упорядоченной иерархии спиралей, в основе которой лежит нуклеосома, в митозе и мейозе хромосомы эукариот совершают цикл компактизации – декомпактизации.

Генетическая информация каждого человека сохраняется в 23 парах хромосом, которые отличаются и размерами и формой. Хромосома 1 - самая большая, ее размер более чем в три раза больше, чем размер 22 хромосомы. Двадцать третья пара хромосом - это две специальные хромосомы - X и Y, которые определяют наш пол (половые хромосомы).

В центре каждой хромосомы содержится - центромера, небольшой участок, который делит хромосому на две части, образуя при этом длинное плечо (q) и короткое плечо (p).

При детальном исследовании хромосом, используя метод окраски специальными красителями, обнаруживается уникальная полосатая структура каждой хромосомы. Если каждой полоске присвоить номер, то можно определить (локализовать) конкретную часть хромосомы (локус). Метод изучения генома, при котором положение данного гена определяется размещением его на конкретной полосе хромосомы, называется цитогенетическим картированием. Например, ген β -гемоглобина (HBB) размещен на хромосоме 11p15.4. Это означает, что ген HBB расположен на коротком плече (p) хромосомы 11 и находится на 4 полосе 15 участка этой хромосомы.

Структура гена. Особенности генома эукариот

Ген – участок ДНК, несущий информацию о строении одного полипептида или одной РНК.

В последние годы произошло некоторое уточнение и теперь считается, что ген - *ассоциированный с регуляторными последовательностями фрагмент молекулы ДНК, соответствующий единице транскрипции на хромосоме.*

Гены человека, как и других высших организмов, включают экзоны и интроны. Экзоны содержат кодирующие последовательности гена, а интроны - не кодирующие. Функции интронов остаются не до конца выясненными, а они, как правило, составляют основную часть гена.

С момента открытия в 1988 г. стало известно несколько важных функций интронов:

- наличие интронов открывает возможность альтернативного сплайсинга, благодаря которому один ген может кодировать несколько различных белков;

- некоторые интроны содержат энхансеры и способны активно регулировать экспрессию генов, к которым они принадлежат;
- транскрибированные интроны способны участвовать в организации процессов авторегуляции синтеза белка путем нарушения созревания пре-мРНК, а следовательно экспорт и трансляцию.

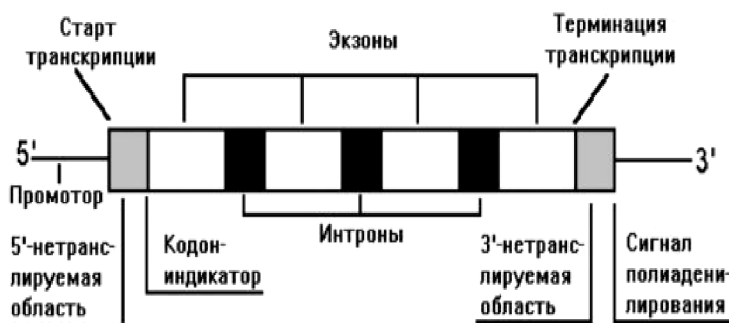


Рис.3. Модель общей структуры гена человека

На границе экзонов и интронов располагается консенсусная, эволюционно консервативная последовательность, которая распознается ферментами сплайсинга, т.е. ферментами для вырезания интронов из первичного транскрипта мРНК. На 3'-конце гена уже в некодирующей части расположен сайт, обеспечивающий добавление 100 - 200 остатков адениловой кислоты к мРНК для обеспечения ее стабильности.

Для каждого гена характерна так называемая открытая рамка считывания, т.е. наличие последовательности триплетов, кодирующих аминокислоты, неперебиваемые стоп-кодонами или бессмысленными триплетами.

У эукариот около 5% ДНК составляют экзоны, 25% – интроны, а остальные 70% составляют спейсеры – не-транскрибируемые участки ДНК между генами. К ним относятся участки:

- принимающие участие в компактизации ДНК;
- принимающие участие в укладке хроматина в интерфазном ядре, в том числе прикрепляющие ДНК к ядерной оболочке изнутри;
- центромеры – участки, к которым прикрепляются нити веретена деления;
- теломеры – концевые участки хромосом, выполняющие защитную роль;
- промоторы, операторы, энхансеры и терминатор.

Главная количественная особенность генетического материала эукариот – наличие избыточной ДНК. Этот факт легко выявляется при анализе отношения числа генов к количеству ДНК в геноме бактерий и млекопитающих. Например, у человека насчитывают приблизительно 28 тысяч генов. В то же время размер генома человека 3×10^9 п.н. Это означает, что кодирующая часть его генома составляет всего 15-20 % от тотальной ДНК. Существует значительное число видов, геном которых в десятки раз больше генома человека, например некоторые рыбы, амфибии и др. Избыточная ДНК характерна для всех эукариот.

В конце 60-х годов работами американских ученых Р. Бриттена, Э. Дэвидсона и др. была открыта фундаментальная особенность молекулярной структуры генома эукариот – повторяемость нуклеотидных последовательностей, которые условно подразделяются на несколько видов:

1. Уникальные повторы - последовательности, представленные в одном экземпляре или немногими копиями.

2. Низкочастотные повторы – последовательности, повторяющиеся десятки раз.

3. Промежуточные, или среднечастотные повторы – последовательности, повторяющиеся сотни и тысячи раз. К ним относятся гены рРНК, тРНК, гены рибосомных белков и белков-гистонов.

4. Высокочастотные повторы, число которых достигает до 10 миллионов на геном. Это короткие (~ 10 п.н.) не кодирующие последовательности нуклеотидов – сателлитная ДНК.

Повторы образуют так называемые семейства, под которыми понимают совокупность последовательностей, полностью или по большей части гомологичных друг другу.

Функции большинства повторяющихся и уникальных последовательностей пока не определены. Еще в 30-х годах было показано, что в генетическом отношении эти районы инертны, т. е. не содержат генов. Следует отметить, что эта фракция у огромного большинства видов занимает не более 10% генома. Близкие виды, например мышь и крыса, имеют совершенно различные высокочастотные последовательности, у крысы их нуклеотидный состав не отличается от основной ДНК, тогда как геном мыши содержит четкий АТ - богатый сателлит. Это означает, что высокочастотная ДНК способна к быстрым изменениям в ходе видообразования.

В высокочастотных последовательностях ДНК, в их качественном и количественном составе отражается тож-

дество молекулярной организации и генетических свойств хромосомной ДНК эукариот. Эта особенность строения ДНК широко используется в различных методах изучения нуклеиновых кислот, молекулярной биологии, генетике и др.

Реализация генетической информации в клетке

Сложившиеся представления о переносе генетической информации по схеме ДНК → РНК → белок принято называть «центральной догмой» молекулярной биологии. Наряду с этим направлением переноса, который иногда обозначают как «общий перенос», известна и другая форма реализации генетической информации, обнаруженная у РНК-содержащих вирусов. В этом случае наблюдается процесс, получивший название обратной транскрипции, когда вирусная РНК, проникшая в клетку-хозяина, служит матрицей для синтеза комплементарной ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы (ревертазы). Следовательно, генетическая информация осуществляется по схеме РНК → ДНК → РНК → белок.

Первым этапом общего переноса генетической информации является *транскрипция*, которую можно приставить как процесс биосинтеза молекул иРНК (мРНК) по принципу комплиментарности на основе отдельного гена.

Поскольку структурные гены укариот имеют прерывистое (мозаичное) строение, то их транскрипция имеет специфические особенности, отличающие ее от транскрипции у прокариот. Процесс начинается с транскрибирования всей нуклеотидной последовательности, содержащей как экзонные, так и интронные участки ДНК. Сле-

довательно, образовавшаяся при этом молекула мРНК отражает структуру всего мозаичного гена. Её называют проматричная РНК (про-мРНК), которая затем претерпевает процесс созревания (процессинг мРНК).

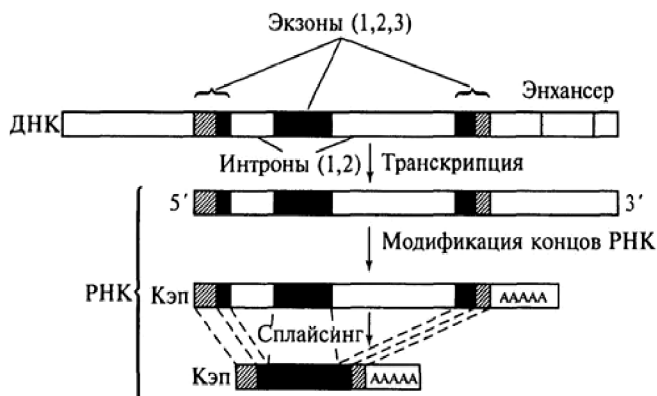


Рис.4. Процессинг мРНК β -глобинового гена человека

Процессинг состоит в ферментативном разрезании первичного транскрипта с последующим удалением его участков соответствующих интронам и воссоединением (сплайсингом) участков комплементарных экзонам, формируя, таким образом, непрерывную кодирующую последовательность зрелой мРНК. Во время процессинга происходит также модификация 5'-и 3'-концов формирующейся молекулы мРНК.

Энхансеры представляют собой протяженные последовательности нуклеотидов, которые содержат сайты связывания нескольких факторов транскрипции. Энхансер увеличивает эффективность транскрипции гена в десятки и сотни раз. Характерными свойствами энхансера являются

его способность осуществлять регуляторное действие на промотор на больших расстояниях от него и вне зависимости от ориентации по отношению к направлению транскрипции гена.

Кэп (от англ. сар-колпачок, шапочка) - представляет собой остаток 7-метилгуанозина, присоединенный к соседнему нуклеотиду с помощью 3' фосфатной связи. Предполагается, что основная функция кэпа связана с узнаванием специфической последовательности молекулы рРНК, входящей в состав рибосомы, что обеспечивает точное прикрепление молекулы мРНК к определенному участку этой рибосомы и инициацию процесса трансляции. Возможно также, что кэп предохраняет мРНК от преждевременного ферментативного разрушения во время ее транспортировки из ядра в цитоплазму клетки.

Со стороны 3' конца мРНК имеется полиадениловый (поли А) «хвост», состоящий из 100-200 последовательно соединенных остатков адениловой кислоты. Предполагается, что поли А «хвост» обеспечивает транспорт мРНК к рибосоме, защищая ее от ферментативного разрушения, но сам при этом постепенно разрушается ферментами цитоплазмы.

Следующим этапом реализации генетической информации является *трансляция*, суть которой заключается в синтезе полипептида на рибосоме, при котором в качестве матрицы используется молекула мРНК.

Трансляцию можно представить как процесс перевода «нуклеотидного языка» иРНК на «аминокислотный язык» полипептидной цепи молекулы белка. Происходит данный процесс благодаря тому, что в нуклеотидной последова-

тельности мРНК имеются кодовые «слова» для каждой аминокислоты – генетический код. Каждое последовательное тройное сочетание нуклеотидов кодирует одну аминокислоту – кодон. Генетический код состоит из 64 кодонов.

Генетический код является вырожденным. Это означает, что большинство аминокислот кодируется несколькими кодонами. Последовательность первых двух нуклеотидов определяет специфичность каждого кодона, т.е. кодоны кодирующие одну и ту же аминокислоту различаются только третьими нуклеотидами.

Другой отличительной особенностью генетического кода является его непрерывность, отсутствие «знаков препинания», т.е. сигналов, указывающих на конец одного кодона и начало другого. Другими словами, код является линейным, однонаправленным и непрерывающимся. Наиболее существенной особенностью кода является его универсальность для всех живых организмов от бактерий до человека. Код не подвергся существенным изменениям за миллионы лет эволюции.

Среди 64 кодонов 3, а именно УАГ, УАА, УГА, называются «бессмысленными». Эти кодоны выполняют функцию сигналов терминации в синтезе полипептида в рибосомах.

Как и транскрипция, процесс трансляции условно подразделяется на три основные стадии: инициация, элонгация и терминация.

Инициация трансляции обеспечивается соединением молекулы мРНК с определенной областью малой субъединицы диссоциированной рибосомы и формированием иницирующего комплекса с участием также белковых факто-

ров инициации (ИФ-1, ИФ-2, ИФ-3) и иницирующей аминоацил- тРНК (формилметионил-тРНК). В начале этой стадии формируются два тройных комплекса: первый комплекс – м. РНК + малая субъединица + ИФ-3, второй комплекс – формилметионил-т. РНК + ИФ-2 + ГТФ. После формирования тройные комплексы объединяются с большой субъединицей рибосомы. После сборки комплекса иницирующая формилметионил-тРНК связывается с первым кодоном АУГ матричной РНК и располагается в П-центре (пептидильный центр) большой субъединицы. А-центр (аминоацильный центр) остается свободным, он будет задействован на стадии элонгации для связывания аминоацил-т. РНК.

Процесс элонгации непосредственно связан с большой субъединицей рибосом, которая имеет специфические участки (центры) – А (аминокислотный), Р (пептидильный). Начинается после того как А-центр занимается с аминоацил-тРНК согласно кодону мРНК. Следующим шагом элонгации является транспептидирование - образование первой пептидной связи между иницирующей и последующей (второй) аминокислотами на А центре. Затем происходит перемещение рибосомы на один триплет мРНК в направлении 5'→ 3' – транслокация. Сопровождается отсоединением иницирующей тРНК от матрицы и от иницирующей аминокислоты и выходом ее в цитоплазму. При этом вторая по счету аминоацил-тРНК передвигается из А-участка в Р-участок, а освободившийся А -участок занимается следующей (третьей по счету) аминоацил-тРНК. Процесс последовательного передвижения рибосомы «триплетными шагами» по нити мРНК повторяется,

сопровождаясь освобождением тРНК, поступающих в Р-участок, и наращиванием аминокислотной последовательности синтезируемого полипептида.

Терминация трансляции связана с вхождением одного из трех известных стоп-триплетов мРНК в А-центр рибосомы. Из-за отсутствия тРНК, соответствующих этим кодонам, пептидил-тРНК остаётся связанной с Р-центром рибосомы. Стоп-кодона не несут информацию о какой-либо аминокислоте, но узнаются соответствующими белками терминации - RF1 или RF2, которые катализируют отсоединение полипептидной цепи от мРНК, а также RF3, который вызывает диссоциацию мРНК из рибосомы. Одновременно происходит диссоциация и самих рибосом.

Посттрансляционная модификация полипептида представляет собой завершающий этап реализации генетической информации в клетке, приводящий к превращению синтезированного полипептида в функционально активную молекулу белка. При этом первичный полипептид может претерпевать процессинг, состоящий в ферментативном удалении иницирующих аминокислот, отщеплении других (ненужных) аминокислотных остатков и формирование уровней структурной организации и др.

3. Ферменты генной инженерии

В генетической инженерии используется большая группа ферментов. Успехи генетической инженерии стали возможны, прежде всего, благодаря изучению ферментов, позволяющих проводить химические операции с генетическим материалом. В генетической инженерии ферменты служат инструментами молекулярного манипулирования с

генетическим материалом, где они выступают в роли "скальпеля", "ножниц" и "ниток для сшивания". Ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК, можно разделить на несколько групп:

- ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (рестриктазы);
- ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (обратные транскриптазы);
- ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (лигазы);
- ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК.

Рестриктазы

Рестриктазы – специфические эндонуклеазы, расщепляющие молекулу ДНК в строго определенных точках (сайтах рестрикции). Впервые были выделены из *E. Coli* в 1968г.

Основной характеристикой рестриктаз является их субстратная специфичность. Сейчас известны следующие основные проявления специфичности этих ферментов: узнаваемая последовательность, место расщепления, зависимость действия рестриктаз от метилирования оснований в пределах узнаваемой последовательности.

Узнаваемая последовательность нуклеотидов в молекулярной биологии называется - *сайт рестрикции* и является наиболее важным параметром рестриктаз. Сайт рестрикции характеризуется последовательностью нуклеотидов, их числом, а также типом строения. Для большинства участков, узнаваемых рестриктазами, характерна вращательная симметрия второго порядка, т. е. они являются па-

линдрами. Несмотря на то, что все рестриктазы узнают на ДНК строго определенные последовательности, различают 3 основных класса рестриктаз.

Рестриктазы 1-го класса осуществляют разрывы в произвольных точках молекулы ДНК, точнее на произвольном от сайтов рестрикции расстоянии.

Рестриктазы 3-го класса узнают и расщепляют ДНК на фиксированном от сайтов рестрикции расстоянии.

Рестриктазы 2-го класса расщепляют ДНК только внутри сайтов узнавания.

В молекулярной биотехнологии в целом, и в генной инженерии в частности, используются исключительно ферменты второго класса. В настоящее время выделено около 500 рестриктаз этого класса.

Большинство рестриктаз класса 2 узнают последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупнощепящие. Мелкощепящие рестриктазы узнают тетра nukлеотид и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупнощепящие, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар. Это связано с тем, что вероятность встречаемости определенной последовательности из четырех нуклеотидов гораздо выше, чем последовательности из шести нуклеотидов. Если предположить, что участки узнавания рестриктаз распределены вдоль цепи ДНК случайно, то мишень для ферментов, узнающих последовательность (сайт) из четырех нуклеотидов, должна встречаться в среднем 1 раз через каждые 256 пар оснований, а для ферментов, узнающих шесть нуклеотидов, - через 4096 пар оснований.

В 1973 году Смит и Натанс предложили номенклатуру рестриктаз согласно которой:

- аббревиатура названия каждого фермента является производной от бинарного названия микроорганизма. К первой прописной букве названия рода добавляют две первые строчные буквы вида: *Streptomyces albus* - Sal, *Escherichia coli* – Eco.

- в случае необходимости добавляют обозначение серотипа или штамма, например, Eco B.

- различные системы рестрикции - модификации, кодируемые одной бактериальной клеткой, обозначают римскими цифрами: Hind II, Hind I, Hind III (*Haemophilus influenzae*).

Рестриктазы по-разному расщепляют ДНК. Одни вносят разрывы по оси симметрии узнаваемой последовательности. другие - со сдвигом, со "ступенькой".

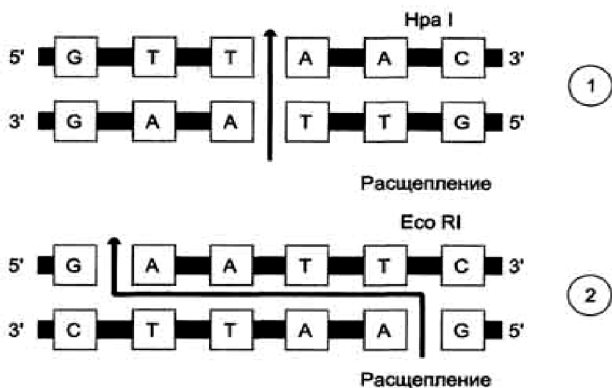


Рис.5. Механизмы расщепления ДНК рестриктазами

В первом случае образуются так называемые "тупые" концы, а во втором - "липкие", то есть фрагменты, имеющие на своих концах однонитевые взаимно комплементарные участки. Такие фрагменты особенно удобны для создания рекомбинантных ДНК

Реакция разрезания осуществляется в две ступени. Сначала разрезается одна цепь ДНК, а затем рядом разрезается другая. В областях, прилегающих с каждой стороны к сайту разрезания, может иметь место экзонуклеотическая деградация, когда фермент узнает один сайт, а разрезает другой, достаточно удаленный от первого. Это явление напрямую связано с «метилированием ДНК». Сайт-мишень может быть полностью метилирован (обе цепи модифицированы), полуметилирован (только одна цепь метилирована) или не метилирован.

Полностью метилированный сайт не подвержен ни рестрикции, ни модификации. Полуметилированный сайт не узнается ферментом рестрикции, но может быть превращен с помощью метилазы в полностью метилированный. У бактерий метилирование, как правило, связано с сохранением имеющегося состояния модификации. Репликация полностью метилированной ДНК ведет к образованию полуметилированной ДНК. Неметилированный сайт-мишень представляет собой субстрат либо для рестрикции, либо для модификации *in vitro*.

ДНК-полимеразы

ДНК-полимеразы обладают способностью удлинять цепь ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$ путем присоединения комплементарного нуклеотида. Впервые ДНК-полимераза

была выделена Корнбергом с сотрудниками в 1958 году из *E. Coli* (Pol I). Фермент состоит из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 109 кДа и имеет 3-х доменную структуру. Каждый домен обладает своей 5' - 3' полимеразной, 3' - 5' экзонуклеазной или 5' - 3' экзонуклеазной активностью.

Известно, что при полимеразной реакции, катализируемой полимеразой с определенной частотой, возможно включение в растущую цепь и некомплементарного нуклеотида, после чего дальнейший рост полинуклеотидной цепи останавливается. Полимераза не может присоединять нуклеотид к неправильно спаренному концу, образовавшемуся при ее участии. 3'—5' экзонуклеаза способствует вырезанию ошибочного нуклеотида, на место которого затем присоединяется правильный нуклеотид - предшественник. Таким образом, 3'—5' экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы играет важную роль в точности полимеризации, направляемой матрицей. 5'—3' экзонуклеазная активность полимеразы способствует деградации одной цепи ДНК, начиная со свободного 5'-конца. В отличие от 3'—5' экзонуклеазы, 5'—3' экзонуклеаза расщепляет диэфирную связь только в спаренных участках двухцепочечной молекулы ДНК и может вырезать с 5'-конца олигонуклеотиды длиной до десяти остатков.

Такое сочетание ферментативных активностей позволяет ДНК-полимеразе играть активную роль в репарации повреждений ДНК *in vivo*.

В молекулярной биотехнологии наиболее часто используются фермент ДНК-полимераза I, выделенная из *E. Coli*, а также термостабильная ДНК-полимераза – Taq-

полимераза, выделенная из бактерий, живущих в горячих источниках (гейзерах). Таq-полимераза сыграла особо важную роль в разработке технологий полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Обратная транскриптаза или ревертаза

Обратная транскриптаза, или ревертаза - РНК-зависимая ДНК-полимераза, с помощью которого осуществляется обратная транскрипция, т.е. синтез ДНК на РНК матрице. Ревертаза кодируется геномами некоторых РНК-содержащих вирусов и подвижных генетических элементов генома высших организмов, в генной инженерии с их помощью можно получить ген. Она используется для транскрипции мРНК в комплементарную цепь ДНК.

Фермент впервые открыт в 1970 г., когда Говард Темин с Сатоши Мизутани, а также независимо от них Дэвид Балтимор выделили искомый фермент в препарате внеклеточных вирионов вируса саркомы Рауса.

Обратная транскриптаза состоит из двух субъединиц с М.м. 65 и 95 кДа и обладает тремя ферментативными активностями: 1) ДНК-полимеразной, использующей в качестве матрицы как РНК, так и ДНК; 2) РНК-азной, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК—ДНК; 3) ДНК-эндонуклеазной, расщепляющей молекулы ДНК по внутренним сложноэфирным связям между нуклеотидами.

Первые две активности необходимы для синтеза вирусной ДНК, а эндонуклеазная, по-видимому, важна для интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина.

Чтобы начать синтез, ревертазе, как и другим полимеразам, необходим короткий участок нуклеиновых ки-

слот (праймер). Праймером может служить одноцепочечный фрагмент как РНК, так и ДНК. Обратную транскриптазу преимущественно используют для транскрипции матричной РНК в комплементарную ДНК (кДНК). Реакцию обратной транскрипции проводят в специально подобранных условиях с использованием сильных ингибиторов РНК-азной активности. При этом удается получать полноразмерные ДНК-копии целевых молекул РНК.

ДНК-лигазы

В 1957 г. молекулярные биологи Метью Мезелсон и Франклин Сталь исследуя механизмы репликации ДНК установили, что репликация ДНК имеет полуконсервативный механизм. Это означает, что каждая дочерняя спираль ДНК состоит из одной старой (материнской) и из одной вновь синтезированной цепи. Это положило начало поискам фермента, участвующего в сшивании фрагментов ДНК и в 1967 году такой фермент был найден и получил название ДНК-лигаза. Он катализирует синтез фосфодиэфирной связи в 2-х цепочечной молекуле нуклеиновой кислоты.

Создание фосфодиэфирных связей в одноцепочечных разрывах двухцепочечной ДНК с помощью ДНК-лигаз является наряду с рестрикцией одним из важнейших этапов получения рекомбинантных ДНК *in vitro*. ДНК-лигазы разделяют на два семейства в зависимости от механизма действия:

1. АТФ-зависимые лигазы;
2. NAD⁺ - зависимые ДНК-лигазы.

Наибольшее применение в генно-инженерных исследованиях сегодняшнего дня находит АТФ-зависимая

ДНК-лигаза бактериофага Т4. Т4-ДНК-лигаза осуществляет соединение фрагментов ДНК, обладающих комплементарными «липкими» или «тупыми» концами. Реакция идет в два этапа. В первом этапе образуется комплекс фермент – АМФ, а во втором – остаток АМФ переносится на 5'-фосфатную группу концевой нуклеотида в точке разрыва ДНК.

Нуклеазы

Нуклеазы – ферменты, гидролизующие молекулы нуклеиновых кислот. В результате действия нуклеаз молекула ДНК или РНК распадается на фрагменты или отдельные нуклеотиды. Различают ДНК-азы и РНК-азы, гидролизующие, соответственно, ДНК и РНК. Различают экзонуклеазы - гидролизующие 5' или 3' концевые фосфатные связи и эндонуклеазы – расщепляющие внутренние связи полинуклеотидной цепи молекулы ДНК. Некоторые нуклеазы гидролизуют избирательно только одноцепочечные молекулы (нуклеаза SI), только двухцепочечные молекулы ДНК (эндонуклеаза III) или гибридные ДНК-РНК-молекулы (рибонуклеаза H).

В молекулярной биотехнологии наиболее широко применяются экзонуклеаза III *E. coli*, нуклеаза S1, панкреатическая рибонуклеаза A, панкреатическая дезоксирибонуклеаза I и др.

Эксонуклеаза III *E. coli* катализирует последовательное отщепление 5'- нуклеотидов ДНК. Фермент обладает также эндонуклеазной активностью, активностью РНКазы H (гидролиз РНК в РНК-ДНК-гибридах) и 3'- фосфатазной активностью.

Нуклеаза S1 из *Aspergillus oryzae* специфически расщепляет молекулы ДНК и РНК с образованием 5'- фосфорилированных моно- и олигонуклеотидов.

Панкреатическая рибонуклеаза А (РНКаза А) является небольшим белком, который обладает активностью эндорибонуклеазы, специфически расщепляющей фосфодиэфирные связи, образованные пиримидиновыми нуклеотидами.

Панкреатическая дезоксирибонуклеаза I (ДНКаза I) представляет собой эндонуклеазу, гидролизующую как одно-, так и двухцепочечную ДНК с образованием сложной смеси моно- и олигонуклеотидов, содержащих 5'-фосфатные группы.

4. Методы изучения генома

Секвенирование нуклеиновых кислот.

Секвенирование (sequencing) – это общее название физико-химических методов, которые позволяют установить первичную структуру (последовательность мономеров) в молекулах биополимеров (белков, нуклеиновых кислот). Известны различные технологии секвенирования.

Технологии ДНК-секвенирования зарождались благодаря работам Уолтера Гилберта и Фредерика Сенгера в 70-х годах прошлого века. В настоящее время секвенирование является важнейшей технологией в установлении функции отдельных генов. В процессе секвенирования генома организма исследователь получает информацию о всей ДНК, находящейся в хромосомах клеток. Эта информация включает также сведения о количестве и последовательности всех генов и некодирующих участков. В основе техноло-

гий секвенирования лежат различные стратегии, основанные на уникальных комбинациях приготовления ДНК-матриц, визуализации, а также выравнивания и составления нуклеотидных последовательностей.

Основным преимуществом современных методик секвенирования является рентабельность и экспрессность. Важнейшим достижением в области секвенирования нуклеиновых кислот, безусловно является успешная реализация международного проекта «Геном человека». В итоге этой работы идентифицированы все гены человека, т. е. точно определено их число, взаиморасположение на генетической карте и структурно-функциональные особенности. В выполнении проекта были задействованы тысячи ученых по биологии, химии, физике, математике. На сегодняшний день это один из самых дорогостоящих научных проектов в истории человеческой цивилизации.

Предполагается, что осуществление этого проекта, помимо колоссальных теоретических обобщений для фундаментальных наук, окажет огромное влияние на понимание патогенеза, предупреждение и лечение наследственных болезней, значительно ускорит исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе развития очень многих моногенных нарушений, будет способствовать более эффективному поиску генетических основ наследственной предрасположенности к различным болезням человека.

К настоящему времени в мире идентифицировано множество генов, ответственных за болезни человека, в том числе болезнь Альцгеймера, болезнь Гоше, атаксию, муковисцидоз, мышечную дистрофию Дюшенна, дисто-

нию, гемофилию А и В, фенилкетонурию, серповидноклеточную анемию и др. Структуры этих генов расшифрованы, и сами они клонированы. Это позволяет проводить эффективную раннюю и даже пренатальную диагностику и лечение.

В настоящее время в практику медико-генетического консультирования введены десятки систем для генодиагностики наиболее распространенных наследственных заболеваний. Установленная последовательность генома поможет идентифицировать новые гены и выявить среди них те, что обуславливают предрасположенность к тем или иным заболеваниям.

В ходе выполнения проекта «Геном человека» были секвенированы геномы целого ряда организмов: бактерий, дрожжей, круглого червя *Caenorhabditis elegans*, мухи-дрозофилы, мыши, крысы, собаки, шимпанзе, рыбы-собаки и растений - арабидопсиса, тополя и двух видов риса. Полученная информация открыла новые возможности для развития сравнительной геномики. Оказалось, к примеру, что из 269 генов человека, мутации которых приводят к болезням, 177 генов имели родственные гены в геноме дрозофилы. Сравнение мышинового генома с человеческим показало, что около 200 геномных блоков у человека и мыши содержат одинаковые гены (хотя и в разных хромосомах). Количество генов у нематоды только в 4-5 раз меньше, чем у человека, и часть из них также являются общими. Это позволяет изучать функции новых генов человека и последствия мутаций известных генов, прослеживая изменение свойств организма в опытах с экспериментальными животными и экстраполируя полу-

ченные результаты на человека. В процессе прочтения генома был выявлен еще один механизм генетического разнообразия, так называемый однонуклеотидный полиморфизм (фактор СНП, по английской транскрипции). СНП - это изменение «буквы» генетического кода без «последствий для здоровья». Считается, что у человека СНП встречается с частотой 0,1 %, т.е. каждый человек отличается от других одним нуклеотидом на каждую тысячу нуклеотидов.

Секвенирование нуклеиновых кислот имеет не менее важное значение для животноводства и ветеринарии. Секвенирование геномов сельскохозяйственных животных широко используется в последние годы для определения изменчивости генов внутри и между породами; для идентификации географической локализации отдельных популяций; для осуществления картирования генов, включая идентификацию носителей известных аллелей генетически детерминированных заболеваний, а также аллелей и генов, ассоциированных с повышенной устойчивостью к инфекционным и неинфекционным заболеваниям; для установления происхождения и генетических взаимосвязей (например, ДНК-фингерпринт) внутри популяции и др.

Полное секвенирование генома крупного рогатого скота, например, было выполнено в 2009 г. и привело к многообещающему открытию для поисков биомаркеров повышенной устойчивости и продуктивности животных.

Благодаря развитию методов геномного сканирования появилось новое направление – «геномная селекция», которое особое значение имеет в области разведения специализированных молочных пород крупного рогатого скота. В

настоящее время под ним подразумевают использование ДНК-матриц (ДНК-биочипов) для генотипирования около 50 тыс. однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в геноме коров, генотипы по SNP которых ассоциированы с желательным проявлением характеристик молочной продуктивности.

В настоящее время используют два основных метода – химический и ферментативный методы секвенирования.

Химическое секвенирование

Химическое секвенирование основано на избирательном разрушении нуклеотидов. Метод предложен в 1977 г. А.М.Максом и В. Гильбертом и называется *метод секвенирования ДНК путем химической дегградации*. В основе метода лежит ограниченное расщепление меченого фрагмента ДНК под действием специфических реагентов.

Для секвенирования этим методом вначале получают одноцепочечную молекулу ДНК, один из концов которой метят с помощью радиоизотопа фосфора - ^{32}P . Препарат меченый ДНК делят на 4 порции и каждую порцию обрабатывают реагентом, специфически разрушающим азотистые основания. Концентрация модифицирующего реагента и продолжительность его воздействия на молекулы ДНК подбирается с таким расчетом, чтобы в каждой молекуле произошла модификация только одного нуклеотида, а поскольку в реакционной смеси присутствует огромное количество таких молекул, то, согласно теории вероятности, все основания данного типа в секвенируемом фрагменте ДНК окажутся модифицированными. Так добавление 60% муравьиной кислоты разрушает пуриновые основания

(аденин и гуанин), добавление диметилсульфата – только гуанина, гидразин разрушает пиримидиновые основания (тимин и цитозин), под действием 1,5 М NaCl разрушается только цитозиновые основания. В результате получается набор меченых фрагментов, длина которых определяются расстоянием от разрушенного азотистого основания до конца молекулы. Фрагменты, образовавшиеся во всех четырех пробах, разделяют путем электрофореза в акриламидном геле. Проводят радиоавтографию и по положению фрагментов, содержащих радиоактивную метку, определяют расстояние от меченого конца где находилось разрушенное основание. Метод Максима - Гельберта имеет ряд недостатков, наиболее значимым среди них является длительность анализа и трудоемкость.

Ферментативное секвенирование

Среди большого многообразия методик ферментативного секвенирования наиболее известным является *метод Сэнгера* предложенный в 1977 г. и получивший название метода терминирующих аналогов трифосфатов. Этот способ, несколько модифицированный, и в более мощном, более технологичном варианте применяется до сих пор. В основе метода лежит ферментативное клонирование ДНК, используя в качестве праймеров синтетических олигонуклеотидов.

Раствор с праймерами распределяют по четырем пробиркам, в каждой из которых находятся четыре дезоксинуклеотида, dATP, dCTP, dGTP и dTTP (один из них — меченный радиоактивным изотопом) и один из четырех 2',3'-дидезоксинуклеотидов (ddATP, ddTTP, ddGTP или

ddCTP). Дидезоксинуклеотид включается по всем позициям в смеси растущих цепей, и после его присоединения рост цепи сразу останавливается.

В результате этого в каждой из четырех пробирок при участии ДНК-полимеразы образуется уникальный набор олигонуклеотидов разной длины, включающих праймерную последовательность. Далее в пробирки добавляют формамид для расхождения цепей и проводят электрофорез в полиакриламидном геле на четырех дорожках. Проводят радиоавтографию, которая позволяет «прочитать» нуклеотидную последовательность секвенируемого сегмента ДНК.

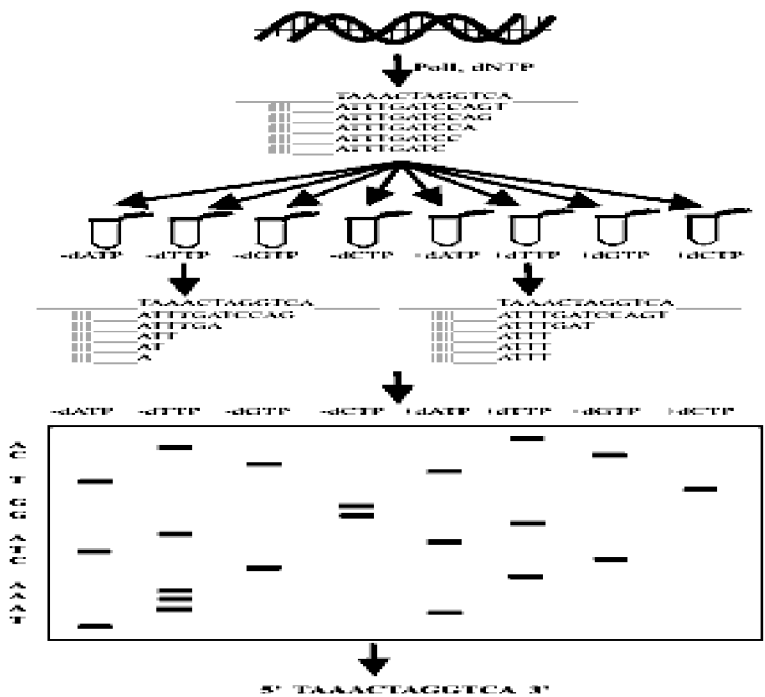


Рис.6. Схема метода секвенирования по Сэнгеру.

В более современном варианте дидезоксинуклеотиды метят четырьмя разными флуоресцентными красителями и проводят ПЦР в одной пробирке. Затем во время электрофореза в полиакриламидном геле луч лазера в определенном месте геля возбуждает флуоресценцию красителей, и детектор определяет, какой нуклеотид в настоящий момент мигрирует через гель. Современные приборы используют для секвенирования ДНК капиллярный электрофорез.

Капиллярный электрофорез, известный также как капиллярный зональный электрофорез (англ. CZE), используется для разделения ионов по заряду. В случае обычного электрофореза заряженные молекулы перемещаются в проводящей жидкости под действием электрического поля. В 1960х годах была предложена методика капиллярного электрофореза для разделения молекул по заряду и размеру в тонком капилляре, заполненном электролитом.

Пиросеквенирование это метод секвенирования ДНК, основанный на принципе «секвенирование путем синтеза». При включении нуклеотида происходит детекция высвобождающихся пирофосфатов. Технология была разработана Полом Ниреном и его студентом Мустафой Ронаги, в Королевском Техническом Институте (Стокгольм) в 1996 году.

Секвенирование путем синтеза основывается на том, что для секвенирования одноцепочечной ДНК ферментативно синтезируют комплементарную цепочку. Метод пиросеквенирования основан на детекции активности фермента ДНК-полимеразы с другим хемилюминесцентным ферментом. Метод позволяет секвенировать одну цепочку нуклеотидов ДНК путем синтеза комплементарной цепоч-

ки, при этом регистрируется присоединение каждого нуклеотида. Матрица ДНК иммобилизована, растворы нуклеотидов А, С, G и Т добавляются и отмываются последовательно после реакции.

Секвенаторы второго поколения

Современные секвенаторы – секвенаторы второго поколения (SGS, second generation sequencing). В них участки ДНК также по-прежнему многократно клонируются, как и в методе по Сэнгеру, но процесс чтения может происходить по разным принципам и существует много разных методов, существенно отличающихся между собой. Однако, несмотря на разные методы получения копий (амплификация) участков генома и на техническую разницу дифференциации различных нуклеотидов в прочтённых последовательностях, общая схема работы для всех секвенаторов одна. Первый этап секвенирования — создание библиотеки случайных последовательностей ДНК, к которым сшиваются с общедоступными адаптерными последовательностями. Второй этап — создание ампликонов, которые используются как образцы. Третий этап — определение первичной структуры всех фрагментов.

Одна из самых популярных на сегодня технологий – секвенирование по методу Solexa (Illumina).

Процесс секвенирования по методу Illumina можно представить в следующих этапах:

1) копии ДНК разрезаются в случайных местах на большое число небольших участков и к каждому из них с двух сторон добавляют специальные адаптеры – заранее известные небольшие последовательности нуклеотидов;

2) полученная смесь помещается на специально подготовленную подложку, из которой в виде решётки «растут» участки ДНК, комплементарные адаптерам. Таким образом, они способны «привязать» снабжённые адаптерами участки ДНК к этим местам. Кроме того, адаптеры также содержат праймеры, участки, к которым может присоединиться ДНК-полимераза, которая осуществляет репликацию ДНК;

3) разные участки ДНК случайным образом «присылаются» к разным местам в решётке, многократно клонируют каждый участок вокруг своего места, получая тем самым целые «кластеры». Этот процесс известен как bridge amplification, потому что ДНК привязывается к подложке сразу двумя концами;

4) участки ДНК денатурируют – в результате из узлов решётки на подложке «растут» разные участки ДНК, состоящие из одной нити;

5) подложка помещается в раствор, содержащий ДНК-полимеразу и специально помеченные нуклеотиды, которые сразу же заканчивают процесс репликации. Они присоединяются к ДНК, по одному к каждому участку. Соответственно, к каждому участку присоединяется та «буква», которая комплементарна к той с которой он начинается;

6) «лишние» нуклеотиды смываются, а метки оставшихся считывают. В технологии Illumina это флуоресцентные метки, которые можно заставить светиться разным цветом и сфотографировать. Именно на этом шаге и узнают, с какой буквы начинается каждый «кластер участков» ДНК;

7) с связанных нуклеотидов химически «срезается» радикал, который мешал дальнейшей надстройке молекулы ДНК, далее возвращаются на этап 5 и повторяют процесс, читая на втором цикле вторые буквы в каждой последовательности, и так далее.

В настоящее время существуют много и других секвенаторов второго поколения с разными показателями свойств.

Одномолекулярное секвенирование Helicos Biosciences - первый метод секвенирования единичных молекул, разработанный HeliScope (Helicos BioSciences) имеет производительность около 1Gb/день. Принцип работы: после клональной амплификации образца происходит фрагментация ДНК с последующим полиаденилированием на 3'-конце с дальнейшим секвенированием, чередующимся с промыванием образцов нуклеотидами с флуоресцентной меткой.

Одномолекулярное секвенирование в реальном времени Pacific Biosciences - метод одномолекулярного секвенирования в реальном времени (Single molecule real time sequencing, SMRT) основан на наблюдении за работой единичной молекулы ДНК-полимеразы. Использование четырех флуоресцентно-меченных нуклеотидов позволяет определить какой нуклеотид присоединяет ДНК-полимераза в данный момент.

Ion Torrent Sequencing - метод основан на связи между химической и цифровой информацией, что позволяет быстрее и проще секвенировать большое количество образцов. Эта технология также называется pH-индуцированным секвенированием. Процесс основан на

детекции протонов, которые получаются при синтезе цепи ДНК как побочный продукт. Как следствие, рН раствора меняется, что и можно детектировать.

Нанопоровое секвенирование - метод основан на измерении тока ионов через единичную нанопору в непроводящей мембране. При прохождении через эту пору нуклеотидов ток падает. Время, на которое изменяется ток ионов, и величина этого падения зависят от того, какой нуклеотид в данный момент находится внутри поры.

Ионно - полупроводниковое секвенирование - недавно появившийся метод секвенирования (на нём основан секвенатор IonTorrent) основанный на детекции соединений (ионов), которые выделяются при присоединении нового нуклеотида к нити ДНК. Это позволяет радикально сократить время и стоимость получаемых рядов, хотя процент ошибок становится больше.

Человеческая мысль не стоит на месте и методы секвенирования постоянно улучшаются. Однако практически все современные методы выдают относительно короткие ряды, от 100 до 400 нуклеотидов. Не существует технологий способных расшифровывать нуклеотидную последовательность целого генома организма. Проект по сборке первого человеческого генома, завершённый в 2003 году, занял 13 лет и стоил 3.8 миллиардов долларов. С тех пор цена секвенирования уменьшалась экспоненциально. Новые технологии секвенирования обещают научиться обрабатывать геном человека за \$1000 и даже меньше, что открывает возможности для массового секвенирования в медицинских целях.

Рестрикционный анализ.

Метод основан на способности ферментов рестрикции (рестриктазы) специфически расщеплять ДНК в определённых сайтах. Рестриктазы стали эффективным инструментом исследования нуклеиновых кислот. Они позволяют превращать молекулы ДНК в набор фрагментов длиной от нескольких сотен до нескольких тысяч оснований. Методом электрофореза в агарозном геле фрагментов ДНК, различающихся по размеру, можно легко разделить, а затем исследовать каждого по отдельности.

При электрофорезе короткие фрагменты мигрируют намного быстрее, чем длинные. При окрашивании гелей красителями, связывающимися с ДНК, выявляется набор полос, каждая из которых соответствует рестрикционному фрагменту.

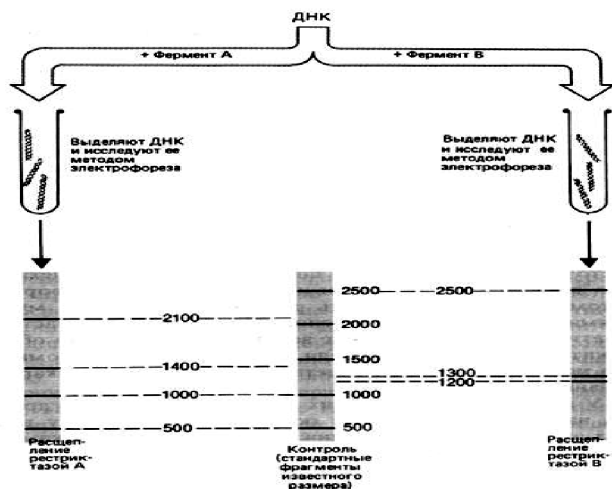


Рис.7. Результаты электрофореза после обработки фрагмента ДНК разными рестриктазами.

Сравнение размеров фрагментов ДНК, полученных после обработки определенного участка генома набором рестриктаз, позволяет построить рестрикционную карту, на которой указано положение каждого сайта рестрикции относительно других участков.

Использование рестриктаз позволили разработать методов получения рекомбинантных молекул, генов, трансгеназа и решения проблем генной инженерии, способствовали разработке эффективных методов секвенирования ДНК.

Полимеразная цепная реакция.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, способ значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов ДНК (клонирование) в биологическом материале.

Метод ПЦР относится к гибридизационным методам анализа ДНК, основанным на достраивании комплементарной полинуклеотидной цепи на одинарной полинуклеотидной цепи - матрице. Принцип метода ПЦР был разработан в начале 80-х годов прошлого столетия в США. В настоящее время метод широко используется в научных исследованиях, в практическом здравоохранении, в службе Госсанэпиднадзора и др.

Основные стадии ПЦР

- 1) денатурация ДНК (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК) при 94—96 °С.
- 2) отжиг при 68 °С, образование коротких двухцепочечных участков ДНК (затравок, необходимых для ини-

циации синтеза ДНК) или связывание нитей ДНК праймерами;

3) элонгация при 72 °С или синтез новой цепи ДНК (комплементарное достраивание обеих нитей);

Две получившиеся ДНК-цепи служат матрицей для следующего цикла, поэтому количество матричной ДНК в ходе каждого цикла удваивается.

Таким образом, в основе метода ПЦР лежит многократное удвоение определённого участка ДНК при помощи ферментов *in vitro*. В результате нарабатывается количество ДНК, достаточное для визуальной детекции.

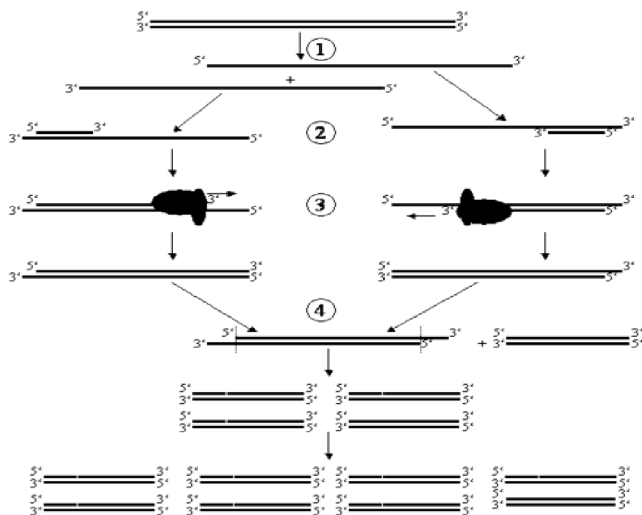


Рис.8. Схематическое изображение первого цикла ПЦР

Кроме простого увеличения числа копий ДНК (этот процесс называется амплификацией), ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом. Широко используется в биологической и ме-

дицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, введения мутаций, выделения новых генов.

Разновидности ПЦР

- «Инвертированная» ПЦР — используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод особенно полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном.

- ПЦР с обратной транскрипцией — используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из РНК. Предварительно проводят на матрице мРНК синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы, которая используется в качестве матрицы для ПЦР.

- ПЦР с горячего старта — модификация ПЦР при которой создаются специальные условия для предотвращения неспецифической амплификации фрагментов ДНК до создания оптимальной температуры реакционной смеси. В одном из вариантов метода для этой цели первоначально ДНК-полимеразу и реакционную смесь разделяют легкоплавким физическим барьером, например, воском или парафином.

- RAPD PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA PCR) - ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК — используется тогда, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы. Например, разные сорта культурных растений, породы собак или близкородственные микроорганизмы.

Методы гибридизации.

Гибридизация ДНК, гибридизация нуклеиновых кислот - соединение *in vitro* комплементарных одноцепочечных нуклеиновых кислот из разных источников в одну молекулу.

В 1961 году было обнаружено, что если комплементарные цепи ДНК, полученные после денатурации, выдержать при температуре 65°C, они легко спариваются, восстанавливая структуру двойной спирали (ренатурация). Подобные процессы могут происходить между двумя любыми одинарными цепями нуклеиновых кислот (ДНК—ДНК, РНК—РНК, ДНК—РНК) при условии, что они содержат комплементарные последовательности нуклеотидов.

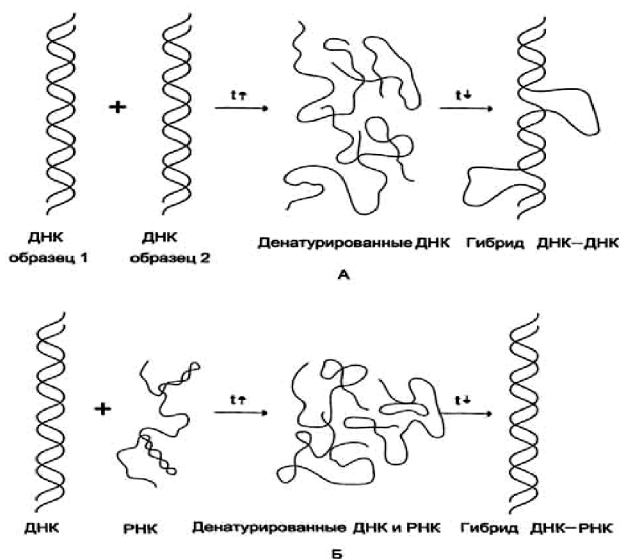


Рис. 9. Способы гибридизации

Если при гибридизации используются участки ДНК (РНК) с известной последовательностью нуклеотидов, то этот метод весьма эффективен для поиска неидентичных, но родственных генов в биопробах. Участки ДНК (РНК) с известной последовательностью нуклеотидов, меченые специальной меткой и используемые для гибридизации называются ДНК (РНК)-зондами. ДНК-зонды применяются в различных целях. Гибридизация ДНК-зонда с РНК, выделенной из анализируемой клетки, может выявить наличие или отсутствие экспрессии гена. Если гибридизации не происходит, значит, ген молчит, не работает. ДНК-зонды также позволяют проводить диагностику инфекционных и наследственных болезней. Методы гибридизации лежат в основе других более современных методов изучения нуклеиновых кислот.

Способность к гибридизации двух препаратов ДНК служит строгим тестом на комплементарность. Существуют два основных способа проведения реакции – *гибридизация в растворе и гибридизация на фильтре*.

В случае гибридизации в растворе препараты однопочечной ДНК смешивают и отжигают непосредственно в растворе. Данный способ имеет существенный недостаток: цепи препарата ДНК могут одновременно ренатурировать с образованием гибридных, так и исходных двухцепочечных молекул ДНК. Поскольку обе реакции конкурируют между собой, то трудно оценить степень гибридизации.

Этот недостаток легко преодолим, если один из препаратов ДНК иммобилизовать так, чтобы он не мог ренатурировать. Для этой цели используют нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтры (мембраны), на поверхности ко-

торых адсорбируют одноцепочечную ДНК. Затем фильтр с иммобилизованной ДНК инкубируют в растворе второго препарата ДНК, который обычно содержит метку (радиоактивную, флуоресцентную и т.п.). Гибридизация иммобилизованной ДНК и ДНК-зондов (т.е. ДНК, содержащей метку) происходит только в том случае, если их последовательности комплементарны. Анализ результатов гибридизации проводят по метке, оставшейся на фильтре. Этот способ гибридизации используется во многих методах криминалистического ДНК-анализа.

Гибридизация, как один из классических методов исследования нуклеиновых кислот лежит в основе многих других методов, таких как рестрикционный анализ, генная дактилоскопия, филогенетический анализ и др.

В рестрикционном анализе, как известно, фрагменты ДНК различной длины могут быть фракционированы методом электрофореза. Для определения длины фрагментов ДНК на гель наносят ДНК или РНК зонды, т.е. пробу, содержащую смесь фрагментов известной длины. Ориентируясь на расположение зонда и полосы фрагмента ДНК неизвестного размера, устанавливают его длину.

Генная дактилоскопия

В настоящее время в криминальной практике широко стали использоваться геномные методы идентификации личности, созданные на базе достижений молекулярной генетики человека. Начало всему этому было положено англичанином А. Джеффрисом, разработавшим «дактилоскопирование» на основе молекулярного анализа ДНК (сейчас это называют ДНК-фингерпринтированием — от

англ. слова *finger* — палец). Метод геномной дактилоскопии дал криминалистам абсолютно надежный тест на идентификацию личности. «Генные отпечатки» позволяют идентифицировать того или иного человека по небольшому количеству практически любого биологического материала (капли крови, одного волоса, слюны, кусочка ногтя, следов пота, спермы). Сообщалось, что разработаны методы, позволяющие проводить идентификацию личности даже по одной лишь клетке.

Суть метода геномной дактилоскопии заключается в том, что за основу берутся повторяющиеся участки генома - микросателлиты. На их основе были созданы зонды, позволяющие определять количество и расположение микросателлитов в геноме того или иного организма. Число и расположение микросателлитов в определенных местах генома для каждого человека строго индивидуально. Например, если в определенном месте нашей молекулы ДНК последовательность ТЦА повторена три раза подряд: ТЦАТЦАТЦА, то вероятность встретить на Земле второго человека, у которого в том же месте ДНК те же три нуклеотида практически исключена.

Процедура установления личности (типирования) состоит в следующем. Первоначально выделяют ДНК из любого биологического материала (кровь, сперма, кусочек кожи, волосаяя луковица). Затем ДНК «нарезают» рестриктазами на фрагменты и подвергают электрофорезу, в результате чего фрагменты выстраиваются в ряд строго по размеру. Далее проводят гибридизацию с использованием зонда приковленного на основе микросателлитного ДНК. Расположение связывающихся с зондом (гибридирующих-

ся) фрагментов определяют методом радиоавтографии или флюоресценции, в зависимости от характера метки зонда. В любом случае в итоге получают «картинку» внешне чем-то напоминающую штриховые коды на упаковках товаров в магазинах.

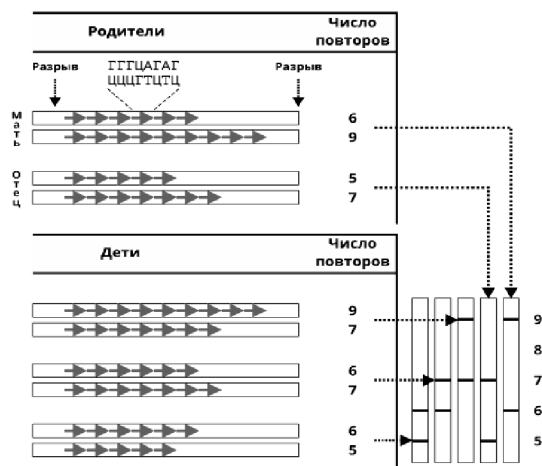


Рис.10. Молекулярный документ (ДНК-фингерпринт), отражающий длины микросателлита, свидетельствующий о родственных отношениях отца и матери с их детьми.

Слева — строение кластеров одного из микросателлитов (ГГСАГГАГ) у родителей и детей, справа внизу — результат анализа длин микросателлитов, осуществленный с помощью электрофореза и гибридизации: все дети рождены этими родителями.

Нокаутирование генов

Нокаут гена (англ. gene knockout) – это метод молекулярной генетики, при котором из организма удаляют или делают неработоспособным определенные гены. Является одним из наиболее важных приемов изучения функций ге-

нов и белков. С помощью удаления или повреждения специфического гена можно получить ценную информацию о его роли в экспрессии определенного белка. Нокаутирование генов позволяет определить, какие изменения происходят в организме в результате отсутствия изучаемого белка. Нокаутные организмы помогают узнать функции генов, нуклеотидная последовательность которых известна. Различия между нокаутным и нормальным организмом могут свидетельствовать о функции выключенного гена.

В настоящее время созданы большое количество линий мышей с нокаутированными генами, которые используются для изучения процессов регуляции экспрессии генов, репарации (восстановления после повреждения) ДНК и развития опухолей.

Созданы экспериментальные животные модели болезни Альцгеймера, процесса старения, рака, диабета, ожирения, сердечно-сосудистых аутоиммунных и многих других заболеваний.

Для получения животных с нокаутированным геном широко используют метод РНК-интерференции.

РНК-интерференция (англ. RNA interference, RNAi) - процесс подавления экспрессии гена на стадии транскрипции или трансляции путем дегградации мРНК при помощи малых молекул двухцепочечной РНК (dsРНК).

Суть механизма РНК-интерференции заключается в том, что при введении в клетки короткой двунитевой РНК она способна вызывать специфическое разрушение той мРНК, с которой имеет гомологию. Сначала dsРНК разрезается специальным ферментом DICER (рибонуклеаза III типа) на короткие фрагменты размером от 19 до 21 п.н.

Полученные короткие молекулы dsРНК образуют специфический комплекс с определенными клеточными белками (РНК-белковый комплекс RISC) обладающей ферментативной активностью. В комплексе РНК содержится в одонитовой форме (малые интерферирующие РНК или siРНК). Благодаря активности RISC, siРНК соединяется с комплементарной последовательностью определенной мРНК, что является сигналом для "разрезания" последней ферментами комплекса. Образующиеся в результате этого короткие фрагменты мРНК уже не способны обеспечивать синтез полноценного белка. Таким образом, конструируя различные dsРНК можно подавлять синтез строго определенных белков в клетке, не изменяя при этом структуру кодирующих их генов.

Термин "РНК-интерференция" для феномена специфического подавления экспрессии генов при введении двухцепочечной РНК был предложен Andrew Fire (1998). К этому времени был уже подробно исследован механизм действия двухцепочечной РНК в клетках млекопитающих, приводящий к прекращению трансляции всех мРНК независимо от последовательности двухцепочечной РНК. В отличие от этого эффекта двухцепочечной РНК, РНК-интерференция предполагает специфическое нарушение экспрессии только тех генов, которые обладают достаточно большой степенью гомологии с введенной двухцепочечной РНК. В последующие годы эффективность РНК-интерференции была продемонстрирована у самых разнообразных беспозвоночных.

Уже сразу после открытия РНК-интерференция стала использоваться как мощный и удобный способ специфиче-

ского подавления экспрессии генов. Одновременно начались исследования самого механизма РНК-интерференции с использованием как молекулярно-генетических, так и биохимических подходов.

Селективный эффект РНК-интерференции на экспрессию генов делает её полезным инструментом для исследований с использованием биокультур клеток и живых организмов. В настоящее время РНК – интерференция используется для крупномасштабных исследований в области молекулярной биологии, биохимии, биотехнологии. Так, например, РНК-интерференцию используют для систематического «выключения» генов в клетках и установления функций генов при изучении деления клетки.

Система РНК-интерференции играет важную роль в защите клеток от вирусов, паразитирующих генов (транспозонов), а также в регуляции развития, дифференцировки и экспрессии генов организма.

Учитывая избирательное подавление синтеза белка, на РНК-интерференцию возлагают большие надежды в борьбе с инфекционными болезнями. Так как, механизм деградации может быть направлен на любую информационную РНК - клеточную, бактериальную или вирусную.

В 2007 году Марио Капекки (Италия), Оливер Смитис и Мартин Эванс (Англия) за «открытие принципов введения специфических генных модификаций в организм мышей посредством эмбриональных стволовых клеток» получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине. По сути это было изобретение метода нокаута генов. Этот метод, разработанный лауреатами в конце восьмидесятых

годов, широко используется в современных генетических исследованиях для определения функций генов.

Метод нокаута генов позволяет получать линии нокаутных мышей (мутантных мышей), у которых выключены определенные гены. Этот метод позволяет исследовать роль каждого конкретного гена в развитии организма и в его нормальной и патологической работе и изучать различные человеческие болезни, используя мышей в качестве модельных объектов. Выключенный ген приводит к тем или иным нарушениям. Характер этих нарушений позволяет судить о функциях данного гена. С тех пор как эта методика была разработана, ее применение позволило создать тысячи различных линий нокаутных мышей, из которых несколько сотен служат модельными объектами для изучения человеческих болезней, в частности заболеваний сердечно-сосудистой и нервной систем и злокачественных опухолей.

В основе метода лежит явление гомологичной рекомбинации - обмена соответствующими участками между парами гомологичных хромосом. Марио Капекки и Оливер Смитис независимо друг от друга изобрели способ выключения (нокаутирования) генов за счет гомологичной рекомбинации с участием искусственно синтезированных фрагментов ДНК, имеющих определенную последовательность нуклеотидов, соответствующую участку одного из генов, но некоторым образом видоизмененную. Такие фрагменты вводят в выращиваемые в культуре (*in vitro*) клетки посредством электропорации. За счет рекомбинации в некоторых из клеток культуры введенная последовательность внедряется в хромосому на место нормальной.

Если видоизменить внедряемую последовательность, то на основе испорченного таким образом гена, у получивших этот ген клеток будет синтезироваться нефункциональный белок или вообще не будет синтезироваться никакого белка. Капекки и Смитис научились включать с помощью этого метода гены в культурах клеток, но разработанная ими технология не позволяла получать нокаутные многоклеточные организмы. В этом отношении продолжателем их работ был Мартин Эванс, который разработал способ выращивания в культуре эмбриональных стволовых (недифференцированных) клеток мышей и впоследствии изобрел метод, позволяющий передавать определенные гены потомству мышей.

Применение метода нокаута генов стало особенно актуальным в последние годы, после завершения секвенирования геномов как человека, так и мыши, а также ряда других видов животных. Последовательно нокаутируя различные гены в пределах мышинного генома, исследователи выясняют функции каждого из них. Учитывая, что у человека и мыши многие гены сходны и выполняют одни и те же функции, нокаутные мыши предоставляют исследователям богатый материал для изучения роли генов человеческого организма в норме и патологических процессах.

По-видимому, рано или поздно благодаря методу нокаута генов удастся изучить свойства всех (нескольких десятков тысяч) генов мышинного генома. Работы в этом направлении ведутся во многих странах мира, в т.ч. и в России.

5. Методы генодиагностики и генотерапии

Генодиагностика - новая область в биологии, использующая молекулярно-генетические методы для выявления предрасположенности к болезни, ранней диагностики, выбора профилактики, медикаментозного лечения и индивидуального подхода к больному. Генная диагностика имеет большое будущее в экспресс-диагностике инфекционных болезней. На ранних этапах инфекции, когда антитела в организме ещё не выработаны, диагностика основана на идентификации антигена, в том числе специфических генов возбудителя.

Развитию генодиагностики способствовали успехи программы "Геном человека" и исследований молекулярных основ патологий живых организмов.

С целью генодиагностики производят исследование белка, РНК и ДНК. Основной объект исследований - ДНК.

Основные методы генодиагностики: гибридизация и электрофорез, ПЦР и их разновидности, о которых было сказано выше.

В настоящее время возникла индустриальная молекулярная биология, в которой применение компьютерных технологий является необходимым условием. Оказалось, что прогресс биотехнологии невозможен без разработки специализированных аппаратных, алгоритмических и программных средств (биоинформатика). Современная экспериментальная техника позволяет создать анализирующую матрицу (биочип) размером несколько сантиметров, при помощи которой можно получить данные о состоянии всех генов организма.

Биологические микрочипы — это совокупность ячеек, расположенных на поверхности стекла или пластика, своего рода миниатюрный аналог сразу нескольких сотен, а то и тысяч реакционных пробирок.

Биологические микрочипы или, как их чаще называют — DNA microarrays (организованное размещение молекул ДНК на специальном носителе) — это один из новейших инструментов биологии и медицины 21 века. Микроскопический размер биочипа позволяет размещать на небольшой площади огромное количество разных молекул ДНК и считывать с этой площади информацию о тысячах различных генетических дефектов, онкогенов, белков и небелковых метаболитов, аллергенов и т.д., что открывает фантастические возможности для генетической диагностики и развития геномной медицины будущего.

Технологии изготовления биочипов могут быть разными. Биочипы по природе нанесенного на подложку материала делятся на «олигонуклеотидные», когда наносятся короткие фрагменты ДНК, обычно принадлежащие к одному и тому же гену, и биочипы на основе ДНК, когда наносятся длинные фрагменты генов (длиной до 1000 нуклеотидов).

Наиболее популярны в настоящее время биочипы на основе кДНК (комплементарная ДНК), ставшие по настоящему революционной технологией в биомедицине.

Молекулы ДНК каждого типа в достаточном количестве копий амплифицируются. Этот процесс может быть автоматизирован, для чего используется специальный робот - умножитель. Полученный генетический материал на-

носятся в заданную точку на стекле («печать») и химически пришивается к стеклу (иммобилизация).



Рис. 11. Схема изготовления матричного биочипа с иммобилизованными зондовыми макромолекулами.

Принцип работы биочипов основан на биохимической реакции, в процессе которой один или несколько образцов ДНК или РНК, полученные из клеток, ткани или органа, метятся одним или несколькими флуоресцентными красителями и гибридизируются с материалом, напечатанным на биочипе.

После того как флуоресцирующие образцы прореагировали, биочип сканируют лазером, освещая поочередно точки нанесения ДНК каждого конкретного типа и следя за интенсивностью сигнала флуоресценции.

Возможности применения биочипов безграничны. Например, ученые из Хельсинки используя чипы, попытались выяснить, какие гены меняют свою активность под

влиянием радиосигнала с частотой 900 МГц, который дают сотовые телефоны. Человеческие клетки из первичного подкожного слоя были выдержаны в культуре под этим сигналом в течение одного часа, после чего РНК из этих клеток и из клеток контрольной серии была пущена в качестве пробы на чип. В результате установили, что в таких условиях резко меняется активность генов «стресс-ответа».

ДНК-микрочипы широко используются для идентификации генов и их мутаций, связанных с различными заболеваниями; для наблюдения за активностью генов; диагностики инфекционных заболеваний и определения наиболее эффективного метода антибиотикотерапии; скрининга микроорганизмов и др.

Биочипы, в отличие от технологий ПЦР в реальном времени или масспектрометрии, позволяют анализировать множество мутаций у одного человека одновременно, и являются удобной и универсальной технологией для массовых исследований генетического полиморфизма и скрининга мутаций. Именно это преимущество особенно важно для персонифицированной медицины будущего. Уже сейчас все чаще в различных областях медицины используются данные о геноме конкретного человека. Преимущества технологии ДНК-микрочипов:

- высокая точность и воспроизводимость.
- низкая себестоимость.
- возможность мультиплексности.

Благодаря разработке методов использования ДНК-микроматриц, на которых прикреплены миллионы эталонных фрагментов ДНК, в настоящее время успешно оценивают в одном геноме десятки тысяч моонуклеотидных

полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphism - SNP). Совокупность этих методов получила название «геномного сканирования» и обеспечила возможность перейти к сравнению генотипов не по штучным генам или локусам, а, одновременно, по целым геномам.

Геномное сканирование стало главным направлением современной эволюционной и популяционной геномики, широко применяется для изучения генома сельскохозяйственных животных. Благодаря развитию методов геномного сканирования появился новый термин – «геномная селекция», которая имеет особое значение в области разведения специализированных молочных пород крупного рогатого скота. В настоящее время под ним подразумевают использование ДНК-матриц (ДНК-биочипов) для генотипирования около 50 тыс. моонуклеотидных замен (SNP) при выявлении геномных участков, генотипы по SNP которых ассоциированы с желательным проявлением характеристик молочной продуктивности

В настоящее время мы являемся свидетелями возникновения нового метода получения и использования информации о живой природе. Данные будут собираться автоматически и на промышленной основе. Развиваются компьютерные технологии, разрабатываются приборы-роботы, которые в автоматическом режиме будут осуществлять подбор биологического материала, подготовку, постановку и интерпретацию биологического эксперимента, а также формулировку наиболее вероятного решения поставленной задачи. На долю исследователя останется только тестирование полученных результатов и выработка ин-

струкций для применения полученного нового знания в соответствующей области.

Генная терапия — метод лечения заболеваний, основанный на переносе в клетки организма определённых генов. Основная проблема генной терапии - разработка эффективного и безопасного способа переноса необходимых генов в дефектные клетки организма. В качестве «средств доставки» генов используют различные векторы, наиболее часто - различные вирусы (см. в разделе «Генетический вектор»). В настоящее время разработки генной терапии касаются только соматических клеток.

14 сентября 1990 г. была проведена первая успешная попытка коррекции генных дефектов при наследуемом Т-клеточном иммунодефиците, связанном с недостаточностью фермента аденозиндезаминазы. Двум больным девочкам провели пересадку собственных Т-лимфоцитов, в которые был внесён трансген — нормальный ген недостающего фермента. В результате нескольких проведённых инфузий у обеих пациенток наступило полное выздоровление. В настоящее время несколько тысяч больных несут в своём организме клетки, генетически изменённые искусственным путём.

Таким образом лечение заболеваний с помощью генов получило название генотерапии. Сейчас в мире насчитывается более 400 проектов, посвящённых лечению с помощью генотерапии.

Разработке программы по генной терапии предшествуют тщательный анализ тканеспецифической экспрессии соответствующего гена, идентификация первичного биохимического дефекта, исследование структуры, функции и

внутриклеточного распределения его белкового продукта, а также биохимический анализ патологического процесса. Концепция генной терапии существует уже на протяжении последних десятилетий. Она заключается в том, что наиболее радикальным способом борьбы с разного рода заболеваниями, вызываемыми изменениями геноме клеток, должна быть обработка, направленная непосредственно на исправление или уничтожение самой генетической причины заболевания, а не ее следствий.

Существует два типа генотерапии: *заместительная и корректирующая*.

Заместительная генотерапия подразумевает введение в клетку неповрежденного гена. Внесенная копия заменит по функциям сохранившийся в геноме больного дефектный ген. Все проводимые сегодня клинические испытания используют внесение в клетку дополнительных количеств ДНК.

При корректирующей терапии предполагается замена дефектного гена нормальным в результате рекомбинации. Пока этот метод на стадии лабораторных испытаний, так как эффективность его еще очень низка, но последние исследования показывают успехи в лечении некоторых заболеваний.

Существует несколько способов введения новой генетической информации в клетки млекопитающих. Наиболее часто используют два основных подхода, различающиеся природой клеток-мишеней:

- фетальную генотерапию, при которой чужеродную ДНК вводят в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития. При этом ожидается, что введенный материал попадет

во все клетки реципиента (и даже в половые клетки, обеспечив тем самым передачу следующему поколению);

- соматическую генотерапию, при которой генетический материал вводят только в соматические клетки и он не передается половым клеткам.

Есть и третий подход - активация собственных генов организма с целью полного или частичного преодоления действия мутантного гена. Яркий пример такого подхода - использование гидроксимочевины для активации синтеза гемоглобина F у больных с серповидноклеточной анемией.

В настоящее время во многих лабораториях молекулярной биотехнологии мира разрабатываются генетические препараты для лечения различных заболеваний.

Генетический препарат содержит фрагмент генетического материала, вводя которого в организм можно достичь того, что клетка, организм, считывая эту генетическую программу, начинают продуцировать необходимое лекарственное вещество.

Репарация ДНК

Репарация ДНК или генетическая репарация – процесс восстановления исходной нативной структуры ДНК, т.е. способность клеток исправлять химические повреждения и разрывы в молекулах ДНК.

Структура материального носителя наследственной информации - ДНК может нарушаться в результате действия как экзогенных (химических, физических и других агентов среды), так и эндогенных факторов (ошибки матричных процессов, действие ряда метаболитов и т.д.). Как

выяснилось с середины прошлого столетия, клетки всех живых организмов оказываются наделены специальной системой защиты, направленной на восстановление повреждений ДНК, возникших в результате воздействия мутагенных факторов разной природы.

Идея о физиологичности мутационного процесса впервые была высказана еще в 1947 г. М.Е. Лобашевым. Впоследствии несколько исследователей независимо друг от друга предположили участие ферментных систем в восстановлении потенциальных повреждений. Так, изучая механизмы восстановления хромосомных разрывов, вызванных радиацией, Н.В. Лучник (1951 г), С. Вольф и К. Атвуд (1954 г.) впервые указали на существование в клетке специальной системы восстановления потенциальных повреждений. В 1958 г. В.И. Корогодин в экспериментах на диплоидных дрожжах открыл феномен восстановления клеточной жизнеспособности после воздействия рентгеновских и гамма-лучей и совместно с Н.В. Лучником предложил гипотезу, согласно которой непосредственным следствием облучения являются только потенциальные повреждения хромосом, т.е. предмутации.

Репарация ДНК — один из важнейших генетических процессов в клетке, обеспечивающих ее жизнеспособность и сохранение вида в целом. В настоящее время известно несколько механизмов генетической репарации. Одни из них весьма просты и «включаются» сразу же после повреждения ДНК, другие требуют индукции большого числа ферментов, и их действие растянуто во времени. Существуют системы, работающие как до, так и после фазы клеточного деления.

Главный «поставщик» ошибок в нуклеотидной последовательности - репликация ДНК. Общая длина ее молекулы у человека около 2 м и состоит из более 3 млрд. нуклеотидов. Нарушения в первичной структуре ДНК могут быть обусловлены:

- ошибками спаривания - азотистые основания в матричной цепи ДНК в течение короткого времени могут находиться в другой таутомерией форме приводящей к встраиванию аденина вместо цитозина с образованием АГ или ГА пар;
- спонтанным отщеплением азотистого основания от цепи ДНК (например, депуринизация — отщепление пуринов);
- дезаминированием цитозина и превращением его в урацил;
- присоединением метильных или этильных групп к азотистым основаниям, что приводит к изменению свойств основания и к образованию неверной пары.

Наиболее распространенный тип повреждений ДНК - метилирование гуанина. Образовавшийся при этом метилгуанин может связываться с тиминном вместо цитозина, что приводит в следующем цикле репликации к транзиции - замене ГЦ на АТ. Другой часто встречающийся вариант повреждения - дезаминирование 5-метилцитозина, что также ведет к транзиции - замене ГЦ на АТ. Кроме метильных или этильных групп, к основаниям способны присоединяться и более крупные химические группы. Они также препятствуют нормальному протеканию, как репликации, так и транскрипции.

Повреждения ДНК могут индуцироваться и внешними воздействиями: ультрафиолетом, рентгеновскими лучами, химическими соединениями и т.д. Например, УФ-облучение вызывает сшивку соседних тиминовых оснований в цепи ДНК. Образующиеся при этом тиминовые димеры препятствуют к нормальной репликации.

Воздействие рентгеновского излучения, может вызывать одноцепочечные разрывы. Более жесткие излучения приводят к образованию двухцепочечных разрывов ДНК.

Многие из этих повреждений исправляются особыми механизмами клетки - системами генетической репарации, имеющими для жизни организма и вида в целом чрезвычайно важное значение. В результате жесткого контроля и давления отбора они не менее сложны и совершенны, чем системы репликации и транскрипции. С позиций молекулярного механизма, повреждения в молекулах ДНК могут быть устранены тремя путями:

- прямым возвращением к исходному состоянию;
- вырезанием поврежденного участка и заменой его нормальным;
- рекомбинационным восстановлением в обход поврежденного участка.

По отношению к процессу репликации различают два основных типа репарации ДНК: дорепликативную и пострепликативную. Дорепликативная репарация включает в себя фотореактивационную и эксцизионную формы, направленные на вырезание поврежденных участков ДНК. Пострепликативная - осуществляется с помощью механизмов, участвующих в процессах рекомбинации и репликации ДНК.

Репарация может осуществляться как конститутивно с помощью специфического набора ферментов, постоянно присутствующих в нормально функционирующих клетках, так и путем активации группы генов, контролирующих различные клеточные функции, которая больше известна как SOS-репарация.

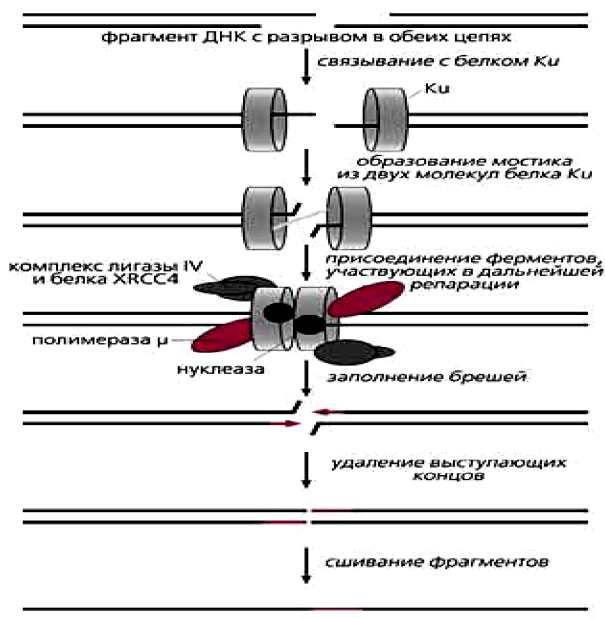


Рис.12. Схема реконструкции ДНК, в которой разорваны обе цепи.

В 2015 году за исследование механизмов репарации ДНК Томас Линдаль (Швеция), Пол Модрич и Азиз Санджар (США) были удостоены Нобелевской премии.

Они доказали, что ДНК чрезвычайно подвержена различным повреждениям и если бы она не исправлялась, то

развитие жизни на Земле было бы невозможным. Расшифровали механизм эксцизионной репарации - когда вырезаются поврежденные участки и заменяются нормальными. Обнаружили механизм вырезания нуклеотидов используемый клетками для восстановления повреждений, наносимых ультрафиолетовым излучением; а также нашли способ, с помощью которого клетки исправляют ошибки в ДНК в процессе деления - репарация ошибочно спаренных оснований, которая происходит когда в одной цепи ДНК пропущено основание, а в другой — нет. Он уменьшает частоту ошибок в ДНК примерно в тысячу раз.

Редактирование генома

Генетическое редактирование — открытие, успешно применяемое уже сегодня в медицинской практике.

В геноме человека содержится около 25 тысяч активных (кодирующих белки) генов. Известно, что их мутации, как минимум, трех тысяч из них вызывают различные заболевания. Закономерно, что идея пресекать болезнь на уровне генов пользуется большим успехом. С помощью «генетических ножниц» — ферментов эндонуклеаз разрезаются цепочки ДНК в определенных местах. Затем фрагмент цепочки можно удалить, отредактировать или заменить новым, «из пробирки».

Две самые эффективные из известных технологий генетического редактирования работают следующим образом. Первая восстанавливает ген, мутация которого вызвала заболевание, доставляя в клетки необходимые участки ДНК. Вторая подавляет активность дефектных генов, пре-

пятствуя образованию белков на их основе. Обе технологии уже успешно применяются в клинической практике.

Последними достижениями науки в области редактирования генома высших организмов являются технологии - CRISPR/Cas9 и TALEN.

Система редактирования CRISPR/Cas9

В основе этой системы лежат особые участки бактериальной ДНК - короткие палиндромные кластерные повторы, или CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Между идентичными повторами располагаются отличающиеся друг от друга фрагменты ДНК — спейсеры, многие из которых соответствуют участкам геномов вирусов, паразитирующих на данной бактерии. При попадании вируса в бактериальную клетку он обнаруживается с помощью специализированных Cas-белков (CRISPR-associated sequence — последовательность, ассоциированная с CRISPR), связанных с CRISPR РНК. Если фрагмент вируса «записан» в спейсере CRISPR РНК, Cas-белки разрезают вирусную ДНК и уничтожают ее, защищая клетку от инфекции.

В начале 2013 года несколько групп ученых показали, что системы CRISPR/Cas могут работать не только в клетках бактерий, но и в клетках высших организмов, а значит, CRISPR/Cas-системы дают возможность исправлять неправильные последовательности генов и таким образом лечить наследственные заболевания человека.

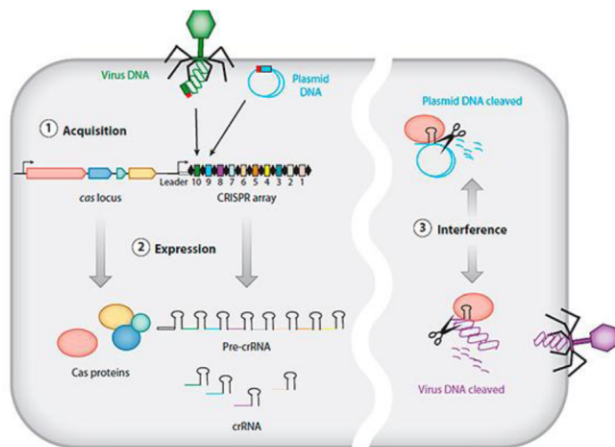


Рис. 13. Схематическое изображение системы CRISPR/Cas (Annual Review of Genetics)

Для бактерий одного вида характерно наличие многочисленных штаммов, которые часто сильно отличаются друг от друга. В некотором смысле штаммы можно рассматривать как аналог рас или пород животных. Один штамм одного и того же вида бактерии может быть совершенно безобидным, а другой — опасным патогеном. У разных штаммов бактерий обнаружилась вариабельность, или полиморфизм, по наличию, отсутствию или порядку спейсеров в CRISPR-кассетах. Это свойство, значение которого было совершенно неизвестно, стало широко использоваться для типирования штаммов и эпидемиологического анализа.

В 2012 году группы Шарпентье и Дженнифер Дудны из Университета Беркли опубликовали совместную статью в *Science*, где предложили способ перепрограммирования системы CRISPR/Cas таким образом, чтобы она стала на-

правленно разрезать ДНК в участках, целенаправленно выбранных исследователем. В природе CRISPR РНК кодируется в CRISPR-кассете, связывается белками и потом узнает мишень. Оказалось, что можно получать CRISPR РНК с помощью химического или ферментативного синтеза и при этом место спейсера в РНК занимает последовательность, выбранная исследователем. Белок Cas9 способен «узнать» и связаться с такой синтетической CRISPR РНК (ее называют «гид») и становится запрограммированным на узнавание и разрезание соответствующего ей места в ДНК. Группы Шарпентье и Дудны продемонстрировали возможность такого подхода *in vitro*.

Практически в это же время научно-исследовательские группы Джорджа Черча и Фенга Жанга (Feng Zhang) из Института Броуда показали, что бактериальный белок Cas9 и гид РНК способны «работать», узнавать и направленно разрезать ДНК в клетках высших организмов и человека.

Механизм геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas9 можно объяснить следующим образом.

У нас двойной набор хромосом — по одному от папы и мамы. Если одна из родительских хромосом «неправильная», то есть в ней изменена последовательность ДНК в каком-то важном гене, может возникнуть состояние носительства генетической болезни, а если обе копии неправильные — возникнет генетическая болезнь. Для того чтобы вылечить генетическую болезнь, нужно исправить генетическую информацию, затронутую мутацией. Чтобы исправить «неправильный» ген, нам нужен очень точный молекулярный «скальпель», который найдет мутантную

последовательность нуклеотидов и сможет «вырезать» ее из ДНК. Таким «скальпелем» и является Cas9. С помощью гида РНК, последовательность которой совпадает с искомым местом, он может внести разрыв в нужное место генома. Узнавание мишени происходит на участке длиной в 20–30 нуклеотидов. В среднем последовательности такой длины встречаются в геноме человека единожды, что позволяет обеспечить точность. Клетка не умрет от внесения разрыва в ДНК, так как он будет исправлен по здоровой копии из парной хромосомы за счет естественного процесса репарации ДНК. Если парной хромосомы нет, то можно внести в клетку участок «правильного» гена одновременно с Cas9 и РНК-гидом, и использовать его как матрицу для заживления внесенного разрыва.

Комплементарное взаимодействие РНК-гида с ДНК-мишенью обеспечивает точность, а белок расщепляет обе нити ДНК.

С помощью CRISPR/Cas9 можно делать мультиплексное редактирование сразу нескольких неправильных генов. Для этого достаточно ввести белок Cas9 и несколько разных РНК-гидов. Каждый из них направит Cas9 к собственной мишени, и вместе они устранят генетическую проблему.

В целом описанный механизм функционирует за счет принципа комплементарности, который впервые был предложен Джимом Уотсоном и Френсисом Криком в их знаменитой модели двуцепочечной ДНК. Цепочки двойной спирали ДНК «узнают» друг друга по правилам комплементарности. CRISPR РНК узнает свои мишени в двуцепочечной ДНК таким же образом, при этом образуется

необычная структура, содержащая двуцепочечный участок взаимодополнительных РНК и одной из цепей ДНК-мишени, а другая цепь ДНК оказывается «вытесненной».

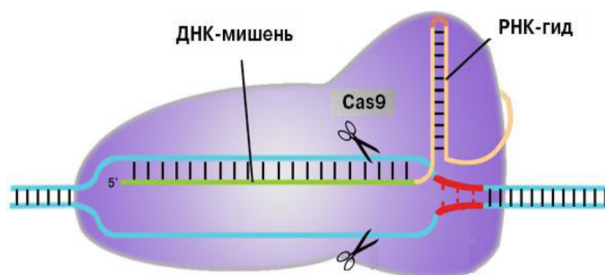


Рис. 14. Схема функционирования CRISPR-Cas9 — конструкции (по Клещенко Е.).

Сегодня CRISPR — одна из самых востребованных технологий. Однако остаются нерешенные проблемы по биологии CRISPR/Cas-систем. Во-первых, не известно, откуда берется большинство спейсеров, так как, только несколько процентов спейсеров имеют вирусное происхождение, а все остальные, подавляющее большинство, не похожи ни на что. Интересен также вопрос эволюционного происхождения CRISPR/Cas-систем. Предложена гипотеза, что они родственны транспозонам — участкам ДНК, которые кодируют специальные белки, занятые перестановкой тех самых участков ДНК, которые их кодируют. Сейчас эту гипотезу стараются подтвердить экспериментально. Во-вторых, весьма актуален вопрос по поиску новых, еще неизвестных CRISPR/Cas-систем. До недавнего времени было известно три разных типа, один из которых, тип II, оказался пригодным для редактирования. С недавнего

времени экспериментально подтверждена наличие трех дополнительных типов этих систем, то есть обо всем их разнообразии пока ничего не известно. А среди неизвестных систем могут быть и более перспективные с практической точки зрения.

Еще одна интересная цель исследований, имеющая и очевидный практический интерес - понять молекулярный механизм узнавания мишени и научиться контролировать этот процесс. Это частный случай общей проблемы специфического взаимодействия макромолекул. Совершенно пока неизвестно, как в клетке молекулы белков, нуклеиновых кислот находят своих «правильных» партнеров и избегают «неправильных» взаимодействия.

Система редактирования TALEN

Параллельно с системой CRISPR/Cas9 развивались и другие подходы к редактированию генома, а именно с помощью TALEN-белков и белков с так называемыми «цинковыми пальцами». Это генно-инженерные белки, которые могут «кусать» ДНК. Ученые пытались научить их узнавать специфическую, в идеале — любую заданную последовательность ДНК. Иногда это работало, но для каждой последовательности приходилось создавать свой отдельный белок, а это кропотливая и долгая работа. Для редактирования же генома с помощью системы CRISPR/Cas9 используется единственный белок, а РНК-гид можно создать за короткое время в любой приличной лаборатории или просто купить.

История разработки этой системы связана с изучением бактерий рода *Xanthomonas*. Эти бактерии являются па-

тогенами таких культурных растений, как рис, перец, томат, они наносят экономически значимый вред сельскому хозяйству, что стало причиной их тщательного изучения. Оказалось, что бактерии секретируют в цитоплазму растительных клеток эффекторные белки (Transcription Activator-Like Effectors, TALE), которые влияют на процессы в растительной клетке и увеличивают ее восприимчивость к патогену. При дальнейшем изучении механизмов действия эффекторных белков было обнаружено, что они способны связываться с ДНК и активировать экспрессию своих генов-мишеней, имитируя факторы транскрипции эукариот.

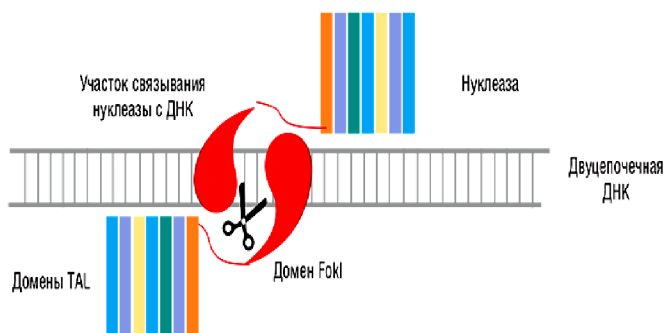


Рис. 15. Схема функционирования TALE системы.

Каждый из белковых доменов TALE узнает один нуклеотид ДНК. Нуклеазы TALENs используют нуклеазный домен FokI.

Белки TALE состоят из центрального домена, ответственного за связывание ДНК, сигнала ядерной локализации и домена, активирующего транскрипцию целевого гена. Впервые способность этих белков связываться с ДНК

была описана в 2007 году, а всего через год был расшифрован код узнавания целевой последовательности ДНК белками TALE.

После расшифровки кода узнавания ДНК белками TALE, который привлек внимание ученых всего мира благодаря своей простоте (один мономер - один нуклеотид), были проведены первые работы по созданию химерных нуклеаз TALENs, экспрессирующие искусственные химерные нуклеазы, которые содержат ДНК-связывающий домен и каталитический домен. Данная система позволяет, комбинируя мономерами доменов создать искусственные нуклеазы, мишенью которых будет любая нуклеотидная последовательность.

Теоретически с помощью искусственных нуклеаз TALENs двухцепочечный разрыв можно внести в любой участок генома, с известными сайтами узнавания ДНК-связывающих доменов.

6. Алгоритм создания генно-инженерного продукта.

Генная инженерия – технология рекомбинантных ДНК. Под рекомбинантными понимают ДНК, образованные объединением *in vitro* (в пробирке) двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников.

Получение рекомбинантных ДНК состоит из нескольких этапов:

- 1) выделение нужного (целевого) гена;
- 2) встраивание его в генетический элемент, способный к репликации (вектор);

- 3). введение вектора в организм-реципиент;
- 4). идентификация (скрининг) и отбор клеток, которые приобрели желаемый ген или гены.

Получение генов

Выделение генов – один из главных этапов в генетической инженерии. В принципе существует два основных способа получения гена: синтез и выделение из ДНК.

Синтез гена осуществляется 2-мя путями – химико-ферментативный синтез и синтез с помощью обратной транскриптазы.

Химико-ферментативный синтез гена.

Впервые химико-ферментативный синтез гена был осуществлен в конце 60-х – в начале 70-х годов XX века индийским ученым Н. Khorana, работавшим в США и который был удостоен Нобелевской премии в 1968 г. Корана вместе со своими сотрудниками синтезировал ген одной тРНК, состоящей из 150 нуклеотидных пар.

Химико-ферментативный синтез генов выполняется в двух стадиях: 1) химический синтез коротких, состоящих из 8-16 нуклеотидов одноцепочечных фрагментов ДНК - олигонуклеотидов. Это осуществляется поэтапным образованием фосфодиэфирных связей между нуклеотидами; 2) полученные олигонуклеотиды сшиваются между собой с помощью фермента ДНК-лигазы. Из одноцепочечных олигонуклеотидов формируют двухцепочечную цепь ДНК.

Первичная структура олигонуклеотидов определяется либо по известной последовательности оснований в гене, либо по методу «чтения с листа». В этом случае за основу берется последовательность аминокислот в нужном белке

и по ней с помощью таблицы генетического кода записывается последовательность нуклеотидов в гене. Структуру олигонуклеотидов выбирают так, чтобы они частично были комплементарны друг с другом.

Сшивание полученных олигонуклеотидов с помощью ДНК-лигазы осуществляется путем последовательного добавления их в реакционную смесь с определенной ионной силой и температурой.

Химико-ферментативный синтез ДНК используют не только для полного синтеза структурных генов, но и для присоединения к ним регуляторных участков (промоторов, участков связывания РНК с рибосомой), а также последовательностей, необходимых для соединения полученных генов с векторными молекулами.

Данный способ является трудоемким и весьма сложным. Преимуществом его являются то, что позволяет точно воссоздать необходимую последовательность нуклеотидов. Кроме того, в процессе синтеза можно ввести различные регуляторные последовательности или участки узнавания различных рестриктаз и т. д. Этим методом получены гены соматостатина, А- и В- цепи инсулина, проинсулина и другие.

Синтез генов с помощью обратной транскрипции

Используя реакцию обратной транскрипции, при помощи ферментов ревертаз (обратные транскриптазы), можно синтезировать практически любой ген в присутствии соответствующих мРНК. Методы выделения последних достаточно хорошо разработаны.

Данный метод основан на универсальной способности обратных транскриптаз синтезировать двунитевую ДНК на одонитевых РНК-матрицах. Функционирование обратных транскриптаз нуждаются лишь в наличии короткой затравочной олигонуклеотидной последовательности РНК или ДНК, комплементарной РНК – матрице (затравка – праймер). Основное требование к праймеру - присутствие на ее 3'-конце свободной ОН-группы, с помощью которой фермент инициирует обратную транскрипцию.

Промоторные и другие регуляторные участки гена достраиваются к ДНК-копии с помощью химико-ферментативного синтеза. Таким образом получены гены, кодирующие синтез белка хрусталика глаза человека, яичного белка и др.

Выделение гена из ДНК

Выделение генов из естественных источников является сложнейшей задачей, так как из многих тысяч генов, имеющих в геноме клетки, нужно выделить единственный конкретный ген, контролирующий развитие того или иного признака. Для этого необходимо точно знать расположение гена и произвести его вырезание при помощи соответствующих ферментов-рестриктаз.

Рестриктазы — это абсолютно необходимый и единственный своего рода инструмент в генной инженерии для вырезания интересующих фрагментов (генов) из больших молекул ДНК. Поскольку известно более 100 ферментов рестрикции, то это позволяет выбор рестриктаз и селективное вырезание фрагментов из исходной ДНК.

Выделенный или синтезированный ген не может самостоятельно встраиваться в ДНК клетки-мишени и тем более начинать функционировать. Для переноса целевого гена создается специальная конструкция - вектор, несущий полученный ген и способный встраиваться в геном клетки.

Генетический вектор

Генетический вектор – это молекула ДНК или РНК, которые способны переносить в клетку чужеродную ДНК, обеспечить её амплификацию и интеграцию в геном.

По профилю использования векторы бывают:

1. Векторы для клонирования – используются для амплификации фрагмента ДНК, встроенного в вектор посредством её репликации.

2. Экспрессионные векторы – для наработки определенного белка, а также для анализа генома и его продуктов.

3. Векторы для трансформации – служат для введения чужеродного фрагмента ДНК в геном реципиента.

Требования векторам:

Вектор должен быть небольшим и содержать сайты рестрикции для нескольких рестриктаз, должен обладать определенной емкостью; быть способным поддерживаться в клетке-хозяине (реплицироваться), многократно копироваться (амплифицироваться), экспрессировать соответствующий ген (содержать соответствующие регуляторные последовательности); должен иметь маркерный ген, позволяющий различать гибридные клетки для эффективной селекции; должен быть способным передаваться в клетку соответствующего организма.

В настоящее время широко применяются, в качестве прокариотических векторов - плазмиды, бактериофаги, а в качестве эукариотических - вирусы животных и растений, а также искусственно сконструированные векторы, способные реплицироваться как в бактериальных, так и в эукариотических клетках (челночные векторы).

Плазмиды - это внехромосомные генетические элементы про- и эукариот, которые автономно реплицируются в клетках.

Бактериальные плазмиды делятся на два класса. Одни плазмиды (например, хорошо изученный фактор F, определяющий пол у *E.coli*) сами способны переходить из клетки в клетку, другие такой способностью не обладают. По ряду причин, и прежде всего для предотвращения неконтролируемого распространения потенциально опасного генетического материала, подавляющее большинство бактериальных плазмидных векторов создано на основе плазмид второго класса.

Как правило, они состоят из факторов переноса и тех или иных детерминантов фенотипических свойств бактерий (лекарственной резистентности, токсичности и т. д.). К настоящему времени плазмиды обнаружены во многих микроорганизмах. Они образовались в результате процесса, который можно назвать «блочной» эволюцией. При этом различные гены объединяются с репликоном, образуя более сложную структуру.

Клеточная организация природных плазмид и дала основание для разработки методов конструирования плазмидных векторов в лабораторных условиях. Оказалось, что плазмиды могут быть «разобраны» и «собраны» по задан-

ной программе с помощью рестриктаз и лигаз, аналогично тому, как это происходит в природе.

Важнейшим компонентом вектора является его репликон - элемент, от которого зависит автономное размножение вектора в клетке-хозяине. Чтобы получить плазмидный вектор, необходимо объединить репликон с генами, которые допускали бы возможность селекции (генетические маркеры). Гены, кодирующие резистентность к антибиотикам, оказались наиболее полезными для этой цели.

Современные плазмидные векторы имеют обычно два маркера резистентности. Например, в векторной плазмиде pBR 322 имеются маркер резистентности к ампициллину и маркер резистентности к тетрациклину.

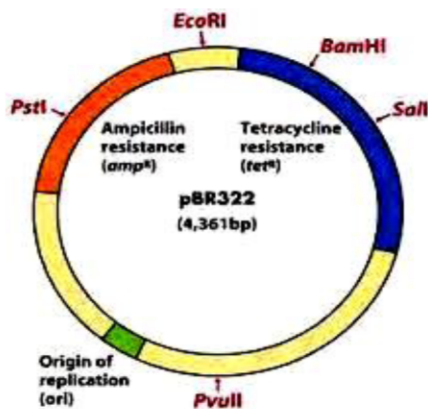


Рис.16. Плазмидный вектор *E.coli* – pBR 322.

Бактериальные клетки, содержащие такой вектор, устойчивы одновременно к ампициллину и тетрациклину. При включении фрагментов ДНК в участок гена резистентности к тетрациклину, устойчивость к тетрациклину

из-за этой вставки нарушается, и все рекомбинантные плазмиды сохраняют устойчивость только к ампициллину. Таким образом, высевая клетки на среды с антибиотиками, можно отобрать клоны, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК.

Особенность плазмиды состоит в том, что в присутствии ингибитора синтеза белка антибиотика хлорамфеникола (опосредованно ингибирующего репликацию хозяйской хромосомы) ее число в *E.coli* возрастает от 20-50 до 1000 молекул на клетку, что позволяет получать большие количества клонируемого гена.

Плазмидный вектор pBR 322 – это наиболее универсальный вектор 80-х годов. Название формируется так:

p – плазида

BR – фамилии авторов: Bolivar, Rodrigues

322 – число, взятое из их исследовательских протоколов.

Длина плазмиды 4361 п.н., она имеет 2 гена устойчивости к антибиотикам: *ампициллину* (*Amp^r*), *тетрациклину* (*Tet^r*), а также сайты для рестриктаз:

- BamHI (*Bacillus amyloliquefaciens* H)
- HindIII (*Haemophilus influenzae* d)
- SalI (*Monella* (*Streptomyces albus*))
- PstI (*Providencia stuartii*)
- EcoRI (*E.Coli*) (*Escherichia coli*).

Плазмидные векторы удобны для клонирования относительно небольших фрагментов (до 10 тыс. пар оснований) геномов, т.е. плазмидные вектора обладают небольшой емкостью. Если же требуется получить клонотеку (или библиотеку) генов высших растений и животных, об-

шая длина генома которых достигает огромных размеров, то обычные плазмидные векторы для этих целей непригодны. Проблему создания библиотек генов для высших эукариот удалось решить с использованием в качестве клонирующих векторов производных бактериофаг.

Бактериофаги – группа вирусов, паразитирующих в бактериальных клетках. Они широко распространены в природе — их выделяют из воды, почвы, организмов различных животных и человека.

Принципы классификации бактериофагов аналогичны подходам к систематике вирусов. В основу классификации положены антигенная структура, морфология фагов, спектр действия, химический состав и др. Большинство фагов относится к ДНК-содержащим вирусам с нуклеокапсидом, организованным по принципу смешанной симметрии.

По спектру действия выделяют типовые фаги (Т-фаги) – лизирующие бактерии отдельных типов внутри вида, моновалентные фаги – лизирующие бактерии одного вида, и поливалентные фаги – лизирующие бактерии нескольких видов.

Среди фаговых векторов наиболее удобные системы созданные на базе геномов бактериофага λ и M13 E.coli. ДНК этих фагов содержит протяженные области, которые можно заменить на чужеродную ДНК, не затрагивая их способности реплицироваться в клетках E.coli. При конструировании векторов на базе ДНК фага из нее сначала (путем делений коротких участков ДНК) удаляют многие сайты рестрикции из области, не существенной для репликации ДНК, и оставляют сайты, предназначенные для

встраивания чужеродной ДНК. В эту же область часто встраивают маркерные гены, позволяющие отличить рекомбинантную ДНК от исходного вектора.

На основе бактериофага λ можно сконструировать векторы емкостью до 25 т.п.н.

Существуют гибридные вектора, содержащие ДНК фага и плазмиды. К ним относятся, например, космиды и фазмиды.

Космиды – плазмидные вектора, в которые встроено участок генома фага λ , обеспечивающий возможность упаковки этой молекулы ДНК в фаговую частицу. Фаговые частицы обеспечивают хорошее проникновение гибридной ДНК в клетку (путем инъекции), после чего происходит замыкание ДНК в кольцо по липким концам и репликация ее по плазмидному типу.

Фазмиды также являются гибридами между фагом и плазмидой. После встройки чужеродной ДНК могут в одних условиях развиваться как фаги, в других – как плазмиды.

Основными компонентами космидного вектора являются: 1) плазмидный репликон, 2) маркер резистентности к антибиотику, 3) фрагмент ДНК фага λ , который содержит так называемый COS – участок или липкие концы, репликон, маркер антибиотикорезистентности.

Плазмиды, содержащие фаговые и бактериальные регуляторные элементы, были использованы для синтеза гормона роста человека, инсулина, интерферона и ряда других белков.

Основная проблема при разработке векторов — преодоление иммунологического барьера реципиента, ограж-

дающего организм от различных внешних воздействий, в том числе и от внедрения чужеродной ДНК в геном клеток. В этом плане особый интерес представляют вирусы, так как из всех известных агентов лишь они способны более или менее успешно интегрировать генетический материал в геном клеток человека. Поэтому все усилия специалистов генной терапии на настоящий момент сконцентрированы в области генной инженерии вирусов, применяемых в качестве векторов, доставляющих терапевтические гены в клетки организма больного.

Векторы на основе РНК-содержащих вирусов.

РНК содержащие вирусы, или ретровирусы (Retroviridae) легко интегрируют в геном клетки-хозяина, тем самым обеспечивая долговременную экспрессию необходимого гена. Для создания генно-терапевтических векторов они считаются наиболее перспективными.

Ретровирусы - обширное семейство вирусов, заражающих преимущественно позвоночных. Это вирусы, которые, как и другие вирусы, для собственного размножения используют сложную молекулярную и надмолекулярную систему жизнеобеспечения клетки, заставляя ее подчиняться своим регуляторным сигналам.

Геном ретровирусов представлен однонитчатой РНК с молекулярной массой 7 мегадальтон и состоит из двух копий, каждая из которых является полноценным геномом и содержит одинаковую генетическую информацию, однако неизвестно, обе ли они функциональны.

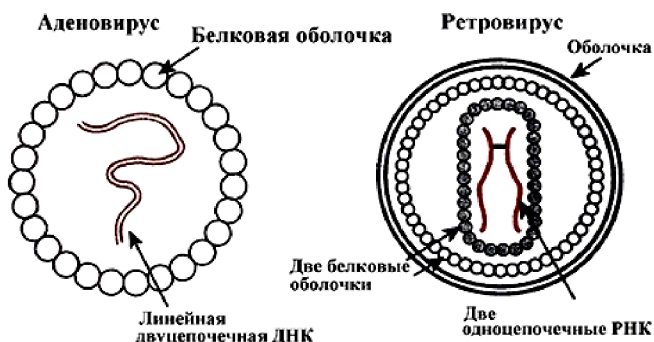


Рис. 17. Вирусы, применяемые для создания терапевтических векторов.

Попадая внутрь клетки, ретровирусная РНК превращается в ДНК путем хорошо теперь известного процесса обратной транскрипции. Эта ДНК встраивается в геномную ДНК и с этого момента становится неотъемлемой частью генома клетки. А вирус становится провирусом.

Таким образом, инфицирование организма ретровирусами – это своего рода естественно-природный механизм генетической модификации клетки.

Ретровирусы относительно безвредны для человека, исключая, конечно, ВИЧ и Т-лимфотропные вирусы человека. Наиболее часто в качестве вектора применяют вирус лейкемии мышей. При разработке векторов из их состава полностью исключают гены, кодирующие синтез продуктов, обеспечивающих репродукцию. Кодированная ёмкость трансгенов в составе ретровирусных векторов не превышает 8000 пар нуклеотидов.

Основные преимущества применения РНК-вирусных векторов — эффективная доставка генетического материала

ла в клетки, поддержка долговременной экспрессии и трансдукция неделящихся клеток (большинство РНК-векторов неспособно к эффективному переносу трансгенов в покоящиеся клетки).

Векторы на основе ДНК-геномных вирусов

Векторы, созданные на основе ДНК-вирусов, обладают большими размерами по сравнению с РНК-вирусами и поэтому могут вмещать фрагменты ДНК (трансгены) длиной до 35 000 пар оснований.

С точки зрения переноса чужеродного ДНК в организм реципиента удобными оказались так называемые "*челючные векторы*", способные реплицироваться как в клетках животных, так и в клетках бактерий. Их получают, сшивая друг с другом большие сегменты вирусов животных и бактерий (например, SV40 и pBR322) так, чтобы районы, ответственные за репликацию ДНК, остались незатронутыми. Это позволяет проводить основные операции по конструированию вектора в бактериальной клетке, а затем полученную рекомбинантную ДНК использовать для клонирования генов в животной клетке.

Сверхъёмкие векторы

Исследование генов в хромосомах высших растений, животных и человека потребовало создания векторов для клонирования фрагментов ДНК длиной в несколько сотен тысяч пар оснований. Этим требованиям отвечает система для клонирования сверхдлинных молекул ДНК на основе искусственно полученной *минихромосомы дрожжей* - YAC (yeast artificial chromosome). YAC-вектор представляет собой кольцевую молекулу ДНК, содержащую ряд гене-

тических элементов, которые позволяют ей существовать во внехромосомном состоянии в клетках дрожжей. В таком векторе удавалось осуществлять клонирование фрагментов ДНК длиной до 700 т.п.н.

Для преодоления трудностей, возникающих при использовании искусственных хромосом дрожжей, были сконструированы альтернативные векторные системы, среди которых наиболее популярными в настоящее время являются системы, основанные на *искусственных хромосомах бактерий* – ВАС (bacterial artificial chromosome).

В векторных системах ВАС используется ДНК хорошо изученного полового фактора (F-фактора) *E. coli* – гигантской плазмиды мужских бактериальных клеток, которые являются донорами бактериальной ДНК при конъюгации с женскими клетками. Типичный F-фактор содержит гены *oriS*, *repE*, *parA* и *parB*, регулирующие его собственную репликацию и контролирующие число его копий в бактериальных клетках.

Современные ВАС-векторы позволяют клонировать фрагменты ДНК длиной до 300 т.п.н. и выше. Рекомбинантные молекулы вводятся в клетки *E. coli* с помощью электропорации, причем эффективность образования трансформантов до 100 раз выше, чем при обычной трансформации сферопластов дрожжей векторами семейства YAC.

Весьма существенным свойством системы клонирования, основанной на векторах семейства ВАС, является ее генетическая стабильность. Исходная структура клонированных фрагментов ДНК в пределах точности использованных методов сохраняется в таких векторах даже после

100 серийных пересевов бактериальных клеток, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК. Все вышеперечисленные свойства переводят векторы семейства ВАС в разряд сверхъемких векторов нового поколения.

Следующая группа сверхъемких векторов - *векторы семейства PAC* (P1- derived artificial chromosome), которые широко используются в современных исследованиях. Векторы этой серии содержат гены бактериофага P-1, обеспечивающие репликацию фаговой хромосомы в зараженных бактериальных клетках. Рекомбинантные ДНК на их основе (размер вставки 150–200 т.п.н.) вводятся в бактериальные клетки с помощью электропорации. Отличительная особенность фага P-1 в том, что поддерживает хромосому в цитоплазме бактериальных клеток в виде кольцевой ковалентно-замкнутой молекулы, напоминающей плазмиду, размер которой составляет 100 т.п.н. Размер репликона, который способен обеспечивать репликацию хромосомы P-1 составляет всего 1,5 т.п.н.

Искусственные хромосомы животных (МАС - Mammalian artificial chromosome) и человека (НАС – Human artificial chromosome).

Стратегия конструирования МАС основана на последовательном укорачивании природных хромосом с сохранением их элементов, обеспечивающих репликацию и митотическую сегрегацию. Эта группа методов известна как фрагментация хромосом, с использованием теломерных последовательностей (telomere-associated chromosome fragmentation – TACF) или укорачивание с помощью теломер (telomere directed truncation – TDT). Метод основан на гомологичной рекомбинации между вектором (YAC) и

укорачиваемой хромосомой, в результате которой происходит замена большей части последовательностей плеч хромосомы на последовательности вектора.

При конструировании МАС искусственную мини-хромосому собирают из отдельных последовательностей, соответствующих теломерам, центромерам и областям начала репликации природных хромосом, с которыми объединяют требуемую рекомбинантную ДНК. Теломерные последовательности животных представляют собой тандемно повторяющиеся последовательности вида (TTAGGG) n , которые, будучи объединенными в повторы длиной около 1 т.п.н., эффективно функционируют в клетках человека.

Конструирование рекомбинантных ДНК

Под рекомбинантными понимают ДНК, образованные объединением *in vitro* двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников.

Как известно, фрагменты ДНК, в том числе и фрагменты содержащие гены, получают в основном с использованием рестриктаз. Рестриктазы могут образовывать фрагменты как с тупыми, так и с липкими концами. Сшивка фрагментов ДНК возможна тремя основными методами, зависящими от того, какие концы имеют фрагменты сшиваемых ДНК:

- сшивка по одноименным "липким" концам (рестриктазно лигазный метод);
- сшивка по "тупым" концам (коннекторный метод);
- сшивка фрагментов с разноименными липкими концами.

*Сшивка по одноименным "липким" концам
(рестриктазно лигазный метод)*

Этот метод является самым распространенным и популярным. Впервые этим способом гибридная ДНК была получена С. Козном в 1973 году. Суть метода состоит в следующем:

1. Рестриктазой класса II разрезают молекулу ДНК на фрагменты с липкими (комплементарными) концами.
2. Препараты различных молекул ДНК, гидролизованных одной и той же рестриктазой, смешивают и липкие концы разных фракций соединяются водородными связями по принципу комплементарности азотистых оснований.
3. С помощью ДНК-лигазы происходит ковалентное связывание фрагментов ДНК. По такой схеме могут быть соединены ковалентно *in vitro* два и более фрагментов, полученных при гидролизе молекулы ДНК одной и той же рестриктазой.

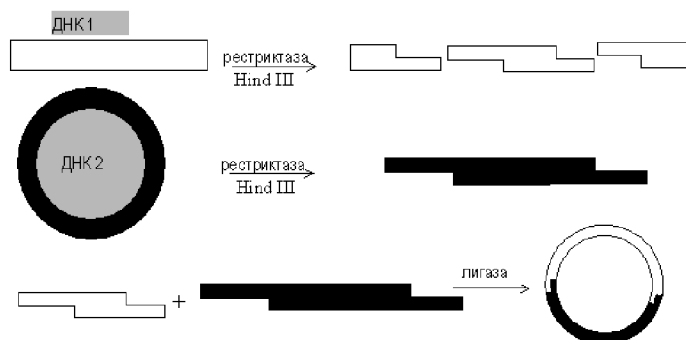


Рис. 18. Схема рестриктазно-лигазного метода

Сшивка по "тупым" концам (коннекторный метод)

Липкие концы не абсолютно необходимы для связывания фрагментов ДНК. Тупые концы также могут быть соединены за счет действия ДНК-лигазы. Однако, в этом случае реакция лигирования имеет свои особенности и ее эффективность ниже, чем при сшивке по липким концам. Впервые такие эксперименты были выполнены в 1972 году П.Бергом в Стенфордском университете. В данной технологии используют фермент - трансферазу из тимуса теленка, которая присоединяет нуклеотиды к 3' - концам цепей ДНК. Если к 3'-концам одного из рекомбинируемых *in vitro* фрагментов ДНК достроить одноцепочечные олиго (dA)-сегменты определенной длины, а к концам другого фрагмента — олиго (dT)-сегменты примерно такой же длины, то при смешении полученных таким образом фрагментов происходит спаривание фрагментов по принципу комплементарности.



Рис.19. Схема коннекторного метода.

Поскольку, таким образом можно формировать достаточно длинные взаимокomплементарные одноцепочечные концы, гибридные молекулы образуются с высокой эффективностью. Поэтому при клонировании ДНК-копий матричных РНК, которые доступны в ограниченных количествах, чаще всего используют коннекторный метод.

Одним из основных недостатков метода является то, что встраиваемые участки ААААА и ТТТТТ могут влиять на функции соединяемых молекул и поэтому всегда, когда только возможно, для получения рекомбинантных молекул ДНК пользуются липкими концами, образовавшимися в результате действия рестриктаз.

Сшивка фрагментов с разноименными липкими концами

В ситуации, когда необходимо сшить фрагменты, образованные разными эндонуклеазами рестрикции, и имеющие разные, то есть неkomплементарные друг другу липкие концы, применяют так называемые линкеры (или "переходники"). Линкеры - это химически синтезированные олигонуклеотиды, представляющие собой сайты рестрикции или их комбинацию. Впервые эту идею предложил Шеллер с сотрудниками в 1977 году. Существуют большие наборы таких генных "переходников". Естественно, что при использовании линкеров должна учитываться необходимость соблюдения правил экспрессии генетической информации. Часто в середину линкера помещают какой-либо регуляторный генетический элемент, например, промотор или участок, связанный с рибосомой. В этом случае линкеры обеспечивают не только объединение генов, но и

обуславливают их экспрессию. Существуют линкеры "тупой конец - липкий конец".

При необходимости липкие концы можно превратить в тупые. Это достигается либо отщеплением липких концов с помощью фермента - эндонуклеазы S1, которая разрушает только одноцепочечную ДНК, либо липкие концы "застраивают", то есть с помощью ДНК-полимеразы I на односторонних липких концах синтезируют вторую нить.

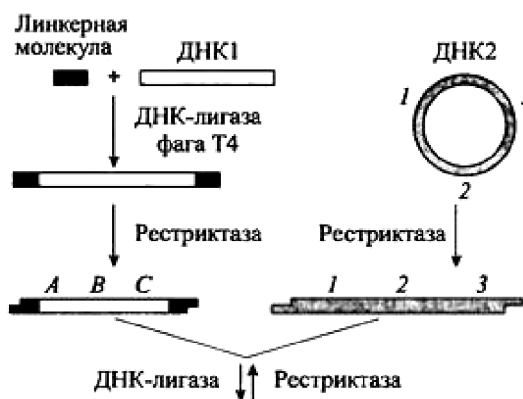


Рис.20. Сшивка фрагментов с разноименными липкими концами

После получения векторной конструкции исследователю необходимо обеспечить «доставку» гена в составе вектора в геном клетки.

Введение рекомбинантных молекул в клетки.

Процесс поглощения клеткой организма свободной молекулы ДНК или её участка из среды и встраивания её в геном, т.е. генетическая модификация клетки, называется – трансформация. В природе широко распространены есте-

ственные способы трансформации генома клетки, например:

- трансдукция – перенос бактериальной ДНК из одной клетки в другую бактериофагами;
- конъюгация – однонаправленный перенос части генетического материала при непосредственном контакте двух бактериальных клеток;
- транспозиция – перемещение определенных генетических элементов (транспозонов) из одного места на хромосоме в другое.

Введение же рекомбинантной ДНК в клетку хозяина проводится различными методами, обладающими различной эффективностью. Каждый из методов доставки чужеродной ДНК в клетки имеет свои особенности, преимущества и недостатки в отношении выживаемости клеток, эффективности введения, универсальности, возможностей технического осуществления. Выбор метода зависит от типа клеток-хозяев и типа использованного вектора, а также от личных предпочтений и возможностей экспериментатора. Наиболее часто используются следующие методы:

1. Микроинъекция. При помощи тончайшей стеклянной трубочки и микроманипулятора в ядро клетки можно ввести векторную ДНК с включенным в нее трансгеном. Число молекул ДНК, вводимых за одну инъекцию, может составлять от 100 до 300 000.

2. Электропорация. Под действием импульсов электрического тока высокого напряжения обратимо увеличивается проницаемость мембран. В результате, через обра-

зующиеся в мембране микропоры, ДНК из окружающей среды проникает в клетку.

3. *Трансфекция.* Вектор обрабатывают ионами кальция и наноконплексы ионов и вектора проникают в клетку путем пиноцитоза. Метод применяют для внедрения трансгенов в эукариотические клетки.

4. *Упаковка в липосомы.* Липосомы – сферические образования, покрытые фосфолипидами и содержащие внутри вектор, способные проникать в клетку вследствие их растворения в липидах плазмалеммы.

5. *Бомбардирование микрочастицами.* Это один из самых эффективных методов трансформации растений. Для внедрения используют незрелые зародыши семян, которые бомбардируют частицами золота или вольфрама, на которые наносится покрытие из вектора. Этими частицами заряжают «генные пушки», после выстрелов из которых частицы проникают в клетки. Клетки в направлении выстрела чаще всего гибнут, в то время как в зоне 0,6-1 см от центра находятся наиболее удачно трансформированные клетки. Частицы могут проникать на глубину 2-3 клеточных слоев. Удивительную по простоте и дешевизне конструкцию «генной пушки» предложил отечественный ученый Р.К. Салаев.

6. *Инфекция вирусом.* Метод является природно-инфекционным способом заражения клетки-хозяина. Основан на особенностях механизма размножения ретровирусов.

В заключении проводят идентификацию клеток, содержащих рекомбинантную ДНК, и их отбор или селекцию. В основном осуществляется на селективной среде по

маркерным генам. Наиболее широко в качестве маркера используются гены устойчивости к антибиотикам. Если в векторной молекуле содержится ген устойчивости к какому-либо антибиотику то соответственно трансформированные клетки будут устойчивы только к этому антибиотику. По этому признаку их отбирают.

7. Генноинженерные продукты.

Рекомбинантный штамм микроорганизма в процессе культивирования синтезирует не свойственный ему продукт, кодируемый встроенным чужеродным геном. В настоящее время получены сотни рекомбинантных штаммов бактерий, дрожжей, вирусов, способных продуцировать разнообразные биологически активные вещества: антигены, антитела, ферменты, гормоны, иммуномодуляторы и др. Разработаны технологии получения сотен медицинских препаратов на основе генетической инженерии. Многие из них внедрены в практику и широко применяются в медицине. Это гормоны (инсулин и соматотропин), антикоагулянты и тромболитики (тканевой активатор плазминогена, факторы VIII и IX), вакцины («дрожжевая» вакцина против гепатита В), иммуномодуляторы (интерфероны и интерлейкины) ферменты (уреаза), диагностические препараты (на ВИЧ-инфекцию, на вирусные гепатиты и др.), моноклональные антитела, колониестимулирующие факторы (макрофагальный, гранулоцитарный и др.), а также многие биологически активные пептиды.

Применение методов генетической инженерии в биотехнологии всегда эффективно, когда нужно вещество невозможно получить другим способом и когда требуется

безопасность для человека и окружающей среды. Например, антигены для создания вакцин против некультивируемых микроорганизмов (плазмодий малярии, возбудитель сифилиса) можно получить только генноинженерным способом. Генноинженерный интерферон превосходит по активности интерферон, полученный из лейкоцитов крови, и значительно дешевле последнего. Приготовление препаратов из антигенов возбудителей особо опасных инфекций (чума, холера) можно заменить биосинтезом их рекомбинантными штаммами непатогенных бактерий.

Методы генетической инженерии находят все большее применение в биологии, в медицине и ветеринарии, за ним большое будущее. Этот метод позволяет получать новые эффективные лекарственные препараты, принципиально новые поливалентные живые (векторные) вакцины, регуляторные белки, осуществлять генодиагностику и генотерапию.

Биоинженерное направление сегодня является одним из самых перспективных в области создания высокоэффективных лекарств, воздействующих на организм намного точнее и эффективнее, чем традиционные химические средства. Уже сегодня сконструированы лекарства, способные бороться с такими ранее неизлечимыми недугами, как СПИД, гепатиты, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, и др. Ежегодно в мире продается более чем на 30 млрд. долл. США препаратов, полученных при помощи генной инженерии.

В зависимости от биологического действия натуральных прототипов рекомбинантных препаратов можно раз-

делить на следующие основные группы:

1. Цитокины:

а) Интерфероны

б) Интерлейкины

в) Факторы роста клеток костного мозга:

2. Гормоны

3. Факторы свертывания крови

4. Ферменты

5. Вакцины

Близко к рекомбинантным препаратам по методу получения и по характеру биологического действия стоят также моноклональные антитела.

Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма. Известно более 100 индивидуальных веществ, относящихся к семейству цитокинов. Гены большинства цитокинов клонированы и получены рекомбинантные аналоги, полностью повторяющие биологические свойства природных молекул. Многие из них применяются в медицине.

Интерфероны - защитные вещества белковой природы, которые вырабатываются клетками в ответ на проникновение вирусов. Выделено три типа интерферонов человека: альфа- бета- и гамма. Интерфероны проявляют свое действие, связываясь в клетках организма со специфическими рецепторами, что в свою очередь ведет к синтезу клетками около тридцати протеинов, благодаря которым и реализуются основные эффекты интерферонов, а именно: противовирусный, противомикробный, противоопухолевый, иммуномодулирующий и др.

Рекомбинантный α -интерферон был первым препаратом, полученным генно-инженерным методом в США в 1984 г. В России из рекомбинантных препаратов именно интерфероны нашли наиболее широкое применение. Препараты интерферонов применяются в первую очередь при вирусных инфекциях, среди которых наиболее изучены острые и хронические вирусные гепатиты, герпетические поражения, грипп, ОРВИ и др.

Интерлейкины - биологически активные вещества, вырабатываемые лейкоцитами и являющиеся посредниками в межклеточных взаимодействиях. Интерлейкины являются главными участниками развития иммунного ответа на внедрение микроорганизмов, формирования воспалительной реакции, осуществления противоопухолевого иммунитета и др. В области синтеза интерлейкинов у России есть существенные достижения. Освоен выпуск нескольких рекомбинантных препаратов на основе интерлейкина-1 человека (ИЛ-1) и интерлейкина-2 человека (ИЛ-2).

Одно из главных свойств ИЛ-1, заключается в его способности одновременно стимулировать функции и увеличивать число лейкоцитов. Основным показанием к применению является токсическая лейкопения II-IV степени, возникающая на фоне химио- и радиотерапии злокачественных опухолей. В качестве иммуностимулятора используется для устранения иммунодепрессии после тяжелых травм, обширных хирургических вмешательств, а также при гнойно-септических и гнойно-деструктивных процессах, хронических септических состояниях.

Интерлейкин-2 (ИЛ-2), продуцируется в организме человека Т-лимфоцитами хелперами и выполняет ключевую роль в процессе инициации и развития иммунного ответа. Препарат стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов, активирует их, в результате чего они становятся цитотоксическими. ИЛ-2 усиливает образование иммуноглобулинов В-клетками, активизирует функцию моноцитов и тканевых макрофагов. В целом, ИЛ-2 обладает иммуномодулирующим действием, направленным на усиление противобактериального, противовирусного, противогрибкового и противоопухолевого иммунного ответа.

Ежедневно в организме человека образуется более 200 миллиардов клеток крови. Этот процесс находится под тонким контролем различных механизмов, одним из которых является система факторов роста клеток костного мозга. Факторы роста миелоидных клеток костного мозга в организме продуцируются различными типами клеток: фибробластами, эндотелиальными клетками, макрофагами, Т-лимфоцитами. Два из четырех ростовых факторов в настоящее время производятся генно-инженерным методом:

1. Колонiestимулирующие факторы - факторы роста лейкоцитарного ростка костного мозга, гормоны стимулирующие образование моноцитов и нейтрофилов в костном мозге (грамостим, филграстим, ленограстим).

2. Фактор роста эритроидного ростка костного мозга, факторы эритропоэза (эритропоэтин или эпотин).

Гормональные рекомбинантные препараты представлены в первую очередь рекомбинантными человеческими инсулинами. В России зарегистрировано около сорока рекомбинантных инсулинов.

Из других рекомбинантных гормональных препаратов на российском рынке, кроме соматотропина и фолликулостимулирующего гормона, Российских аналогов в настоящее время нет.

Тканевые активаторы плазминогена относятся к числу наиболее перспективных лекарственных средств для предотвращения и лечения ишемических поражений - инфаркта миокарда и инсульта коры головного мозга. Рекомбинантные тканевые активаторы плазминогена представлены и двумя российскими препаратами – пуролаза и гемаза, действующим веществом которых является проурокиназа. Проурокиназа человека катализирует превращение плазминогена в плазмин - сериновую протеазу, способную лизировать фибриновые сгустки, и обладает высокой специфичностью действия, так как активизирует плазминоген преимущественно в области тромба, что снижает риск возникновения возможных кровотечений и геморрагий.

Разработана технология производства рекомбинантной супероксиддисмутазы. Как у нас в стране, так и за рубежом получена эффективная рекомбинантная вакцина против гепатита В.

8. Генетическая инженерия растений.

Первые трансгенные растения (растения табака со встроенными генами из микроорганизмов) были получены в 1983 г. После прохождения всех необходимых тестов на токсичность, аллергенность, мутагенность и т.д. первые трансгенные продукты появились в продаже в США в 1994 г. Это были томаты с замедленным созреванием, а также гербицид-устойчивая соя. В настоящее время получением

и испытанием генетически модифицированных растений занимаются сотни коммерческих фирм во всем мире с совокупным капиталом более ста миллиардов долларов. Генно-инженерная биотехнология растений уже стала важной отраслью производства продовольствия и других полезных продуктов.

Нынешний этап развития генетической инженерии растений получил название "метаболическая инженерия". Главным образом, это из-за того, что ставится задачей не столько улучшить те или иные имеющиеся качества растения, как при традиционной селекции, но и «научить» растение производить совершенно новые соединения, используемые в медицине, химическом производстве и в других областях. Этими соединениями могут быть, например, особые жирные кислоты, полезные белки с высоким содержанием незаменимых аминокислот, модифицированные полисахариды, съедобные вакцины, антитела, интерфероны и другие "лекарственные" белки, а также новые полимеры, не засоряющие окружающую среду и многое другое.

Генно-инженерные методы позволяют решать ряд важных задач по повышению устойчивости новых форм, линий, сортов и гибридов сельскохозяйственных растений к различным патогенам и сокращению продолжительности выведения новых сортов.

Генетическая инженерия растений, как и в целом, генная инженерия, состоит из следующих основных этапов:

- выбор гена и его клонирование;
- подбор генотипа растения – реципиента;

- введение гена и его экспрессия в геноме растения-реципиента;
- регенерация трансформированных клеток и отбор трансгенных растений.

Важным преимуществом растений по сравнению с животными является возможность получения целого растения из одной клетки - тотипотентность.

Тотипотентность (англ. totipotency) — способность клетки путем деления дать начало любому клеточному типу организма. Свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свою наследственную программу онтогенетического развития при определенных условиях выращивания вплоть до образования взрослых растений и семян.

Одной из основных проблем при получении трансгенных растений является способ введения чужеродных генов в хромосомы растений, т.е. трансформация растительных клеток.

Генетическая конструкция, вводимая в растительную клетку, обычно включает: белок-кодирующую структурную последовательность, сигнальные элементы трансляции и транскрипции, а также маркерные гены.

Трансформация растительных клеток.

Ввести чужеродную ДНК в растения можно различными способами. Для двудольных растений существует естественный вектор для горизонтального переноса генов - плазмиды агробактерий. Что касается однодольных, хотя и в последние годы достигнуты определенные успехи в их трансформации агробактериальными векторами, все же

подобный путь трансформации встречает существенные затруднения.

Известно, что некоторые виды почвенных бактерий (*Agrobacteria*) могут заражать двудольные растения и вызывать при этом образование специфических опухолей. Опухолевые клетки синтезируют необычные для растения аминокислоты – опины (производные аргинина), которые используются агробактериями в качестве источника азота и углерода. Таким образом, при заражении растений агробактериями происходит перестройка метаболизма трансформированных растительных клеток и они начинают синтезировать соединения, необходимые только для бактерий.

В процессе трансформации клеточная стенка растения повреждается под действием пектолитических ферментов бактерий и обеспечивается плотный контакт бактерий с плазмалеммой растительной клетки. В результате этого контакта ДНК бактерий переносится в растительную клетку.

Наиболее изученными и широко применяемыми являются 2 вида агробактерий. Первый - *Agrobacterium tumefaciens*, второй – *Agrobacterium rhizogenes*.

A. tumefaciens способен индуцировать у растений образование опухолей типа "корончатого галла", что связано с наличием у них Ti-плазмиды (tumor inducing), часть которой встраивается в хромосомы клеток растений.

A. rhizogenes - вызывает заболевание, именуемое "бородатый корень", при котором в зоне повреждения корня образуется масса новых корешков и связано это явление Ri – плазмидой (root inducing).

Подробная информация о структуре плазмид *Agrobacterium* получена путем их рестрикционного или физического картирования. Плазмиды - кольцевые молекулы ДНК, длиной около 200 т.п.н. В бактериальных клетках они способны реплицироваться автономно.

Изучая механизма трансформации выявлено, что ни агробактерия, ни плазида сама не входит в растительную клетку. Переносится в клетку и встраивается в геном только часть плазмиды, которая называется Т-ДНК (трансформирующая ДНК). Длина – около 23 т.п.н. Кроме Т-ДНК в плазидах имеются область кодирующая функцию конъюгации (Tra), область репликации (OriV) и область вирулентности (Vir). Последовательности Ti-плазмиды, фланкирующие Т-ДНК (пограничные или концевые области), играют важную роль в интеграции в растительный геном и содержат повторы по 24 - 25 п. н.

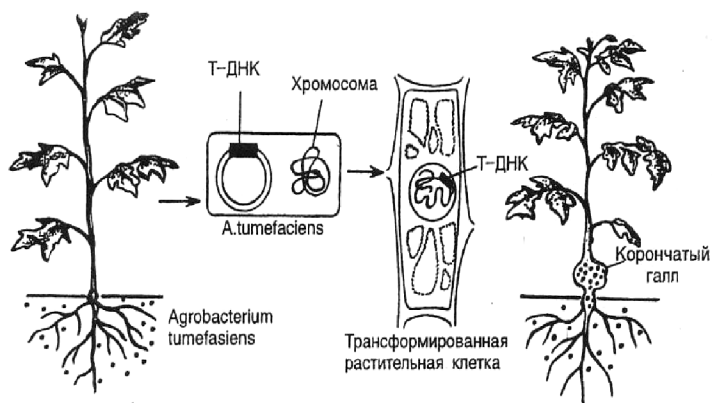


Рис. 21. Интеграция Т-ДНК в хромосому растений и образование опухоли (корончатого галла) по Э.С. Пирузян.

Учитывая важную роль концевой области в переносе Т-ДНК, можно предположить, что любой сегмент ДНК, встроенный между этими концами, может быть перенесен в растения как часть Т-ДНК. Плазмиды модифицируют таким образом, чтобы удалить все онкогенные последовательности, а на их место встроить чужеродную ДНК. В результате плазмида теряет свои онкогенные свойства, неонкогенные Т-ДНК, присутствующие в растениях - регенерантах, передаются согласно законам Менделя.

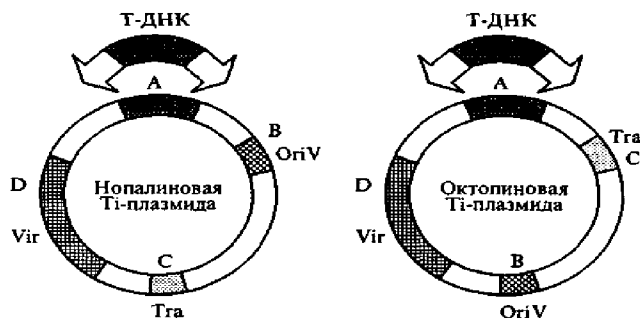


Рис. 22. Структура Ti-плазмид.

Разработаны два метода введения в растения Ti-плазмидных последовательностей, содержащих нужный ген.

Первый метод - метод «промежуточных (коинтегративных) векторов, основан на использовании плазмиды кишечной палочки pBR 322. Т-ДНК вырезают из Ti-плазмиды с помощью рестриктаз и встраивают в плазмиду pBR 322 для клонирования в *E. coli*. В клонированную Т-ДНК с использованием рестриктаз встраивают нужный ген, полученную рекомбинантную молекулу снова размножают в большом количестве, то есть клонируют в ки-

шечной палочке. Затем с помощью конъюгации вводят в клетки агробактерии, несущие полную Ti-плазмиду.

Второй метод основан на создании системы бинарных (двойных) векторов. Последние исследования показали, что для заражения и трансформации не нужна целая Ti-плазида, а достаточны только пограничные области T-ДНК и один участок Ti-плазмиды, ответственный за вирулентность. Причем эти два участка ДНК не обязательно должны находиться в одной и той же плазмиде. Если клетки агробактерий содержат Ti-плазмиду с сегментом *vir* и другую плазмиду с T-ДНК, эти бактерии могут трансформировать клетки растений. При этом T-ДНК с любыми встроенными в нее генами интегрирует с геномом растения, для этого не нужна гомологичная рекомбинация в бактериальных клетках.

Для трансформации растений достаточно широко используются также векторы на основе ДНК-содержащих вирусов. Наиболее перспективным является вирус мозаики белой капусты, поражающий в основном растения семейства капустных. Вирион имеет диаметр около 50 нм, содержащий кольцевую ДНК длиной 8000 нм. Небольшой размер генома позволяет манипулировать *in vitro* вирусной ДНК как бактериальной плазмидой и затем вводить ее в растения путем втирания в листья, при этом происходит инфицирование всех клеток, т.к. вирус размножается быстро и передается от клетки к клетке.

Преимуществом векторных систем на основе вирусов являются малый размер генома, высокая концентрация вирусной ДНК в клетках растений (до 50 000 на клетку), на-

личие сильных промоторов, которые обеспечивают эффективную экспрессию чужеродных генов.

Для трансформации устойчивых к агробактериям растений разработаны приемы прямого физического переноса ДНК в клетку, многие из которых взяты из практики работы с клетками бактерий или животных. Эти методы достаточно разнообразны, они включают: бомбардировку микрочастицами или баллистический метод; электропорацию; обработку полиэтиленгликолем; перенос ДНК в составе липосом и др.

Наиболее продуктивным и чаще всего используемым является метод бомбардировки микрочастицами. При достаточной скорости эти частицы могут непосредственно проникать в ядро, что сильно повышает эффективность трансформации. Этим же методом можно, впрочем, трансформировать и другие ДНК-содержащие клеточные органеллы - хлоропласты и митохондрии.

В последнее время успешно используется также комбинированный метод трансформации, названный агролистическим. При этом чужеродная ДНК вводится в ткани каким-либо физическим методом, например, баллистическим. Вводимая ДНК включает как Т-ДНК, вектор с целевым и маркерным геном, так и агробактериальные гены вирулентности, поставленные под эукариотический промотор. Временная экспрессия генов вирулентности в растительной клетке приводит к синтезу белков, которые позволяют правильно вырезать Т-ДНК из плазмиды и встраивать ее в хозяйский геном, как и при обычной агробактериальной трансформации.

После проведения тем или иным способом трансформации растительной ткани ее помещают *in vitro* на специальную среду с фитогормонами, способствующую размножению клеток. Среда обычно содержит селективный агент, в отношении которого только трансгенные клетки приобретают устойчивость. Регенерация чаще всего проходит через стадию каллуса, после чего при правильном подборе сред начинается органогенез (побегообразование). *Каллус или каллусная ткань - это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из недифференцированных клеток.*

Сформированные побеги переносят на среду укоренения, часто также содержащую селективный агент для более строгого отбора трансгенных особей.

В последние годы ученые используют новый подход для получения трансгенных растений с "antisense RNA" (перевернутой или антисмысловой РНК), который позволяет управлять работой интересующего гена. В этом случае при конструировании вектора копию ДНК (к-ДНК) встраиваемого гена переворачивают на 180°. В результате в трансгенном растении образуется нормальная молекула мРНК и перевернутая, которая в силу комплементарности нормальной мРНК образует с ней комплекс и закодированный белок не синтезируется.

Такой подход, например, был использован для получения трансгенных растений томатов с улучшенным качеством плодов. Вектор включал к-ДНК гена PG, контролирующего синтез полигалактуроназы - фермента, участвующего в разрушении пектина, основного компонента межклеточного пространства растительных тканей. Про-

дукт гена PG синтезируется в период созревания плодов томатов, а увеличение его количества приводит к тому, что томаты становятся более мягкими, что значительно сокращает срок их хранения. Отключение этого гена в трансгенах позволило получить растения томатов с новыми свойствами плодов, которые не только значительно дольше сохранялись, но и сами растения были более устойчивы к грибным заболеваниям.

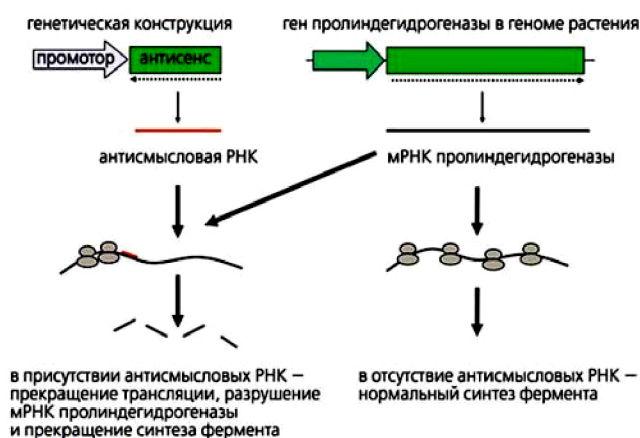


Рис. 23. Схема получения генетически модифицированных растений без трансгена.

Стратегия антисмысловых конструкций широко применима для модификации экспрессии генов. Эта стратегия используется не только для получения растений с новыми качествами, но и для фундаментальных исследований в генетике растений.

9. Генетически модифицированные продукты.

Первые трансгенные продукты начали производиться американской бывшей военной компанией Монсанто в конце 80-х годов. Казалось бы открытие генно-модифицированных организмов (ГМО) – это важнейший шаг в деле победы человека над природой. Ведь возможность создания новых организмов с таким набором генов, который никогда ранее не встречался в природе, позволяют ученым «производить» новые виды животных и растений в лабораторных условиях, т.е. взять процесс эволюции фактически под свой контроль. Однако, с момента появления и за все время существования, проблема генно-модифицированных организмов не перестает тревожить умы, как ученых, так и простых обывателей. Это связано с тем, что их воздействие на организм человека мало изучено.

Огромное количество людей на планете ежедневно употребляют в пищу продукты, содержащие ГМО. Но до сих пор нет однозначного ответа на вопрос: безопасны ли такие продукты? Каково влияние ГМО на организм человека?

Существуют как сторонники, так и противники ГМО. И каждый предлагает свои доводы в защиту собственной теории.

Защитники трансгенных организмов замалчивают влияние ГМО на людей и животных и провозглашают эти продукты как уникальное спасение всего человечества от голода. Ведь население планеты продолжает увеличиваться, а имеющиеся ресурсы уже не способны покрыть все

возрастающие потребности людей в еде. Следовательно, необходимо в несколько раз увеличить объемы производства продуктов питания, в частности сельскохозяйственной продукции. Несомненно, генетически модифицированные организмы обладают рядом преимуществ перед естественно-природных. Это и высокая урожайность, и повышенная морозо- и засухоустойчивость, и способность противостоять многим болезням и вредителям и др.

В свою очередь специалисты-противники ГМО приводят данные исследований, подтверждающих негативное влияние ГМО как на человека, так и в целом на окружающую среду. В многочисленных докладах говорится о том ощутимом вреде, который наносят ГМ-продукты здоровью человека. В частности возможно возникновение аллергических реакций, угнетение иммунной системы человека. Могут быть выявлены различные расстройства обмена веществ.

Опасность ГМО может быть обусловлена несколькими причинами. Во-первых, большое значение имеет, какие именно гены встраиваются. В процессе внедрения гены могут как сами мутировать, так и оказывать негативное воздействие на геном организма-хозяина.

Во-вторых, в результате активности внедренных генов могут образовываться неизвестные токсичные белки, вызывающие токсикозы или аллергию у человека и животных. К тому же растения могут аккумулировать гербициды и пестициды, к которым они устойчивы.

В третьих, особое внимание надо обратить на сами способы встраивания гена, которые еще несовершенны и не гарантируют безопасности растений, созданных с их

помощью. Дело в том, что для встраивания гена используют вирусы, транспозоны или плазмиды, способные проникнуть в клетку организма и затем использовать клеточные ресурсы для создания множества собственных копий или внедриться в клеточный геном (как и «выпрыгнуть» из него).

Методы идентификации ГМО

Разработка методов идентификации ГМО началась одновременно с выходом пищевой продукции из ГМО на мировой продовольственный рынок. В настоящее время подавляющее большинство ГМО растительного происхождения, представленных на рынке, отличается от исходного традиционного сорта растения наличием в геноме рекомбинантной ДНК. Любой ген кодирует первичную структуру определенного белка, который определяет новый признак, и содержит нуклеотидные последовательности регулирующие работу этого гена. Поэтому в качестве мишени для определения ГМО в пищевом продукте могут рассматриваться как новый модифицированный белок, так и рекомбинантная ДНК.

Все методы идентификации ГМИ растительного происхождения подразделяют на 3 группы:

- химические;
- иммунологические;
- молекулярно-генетические (методы ПЦР).

Химические методы направлены на определение соединений, которые могут синтезироваться в клетках ГМО в ответ на внедрение чужеродных генов: трансгенная ДНК, новый экспрессированный белок, ферменты, олигосахари-

ды, высокомолекулярные жирные кислоты, витамины, гормоны и др.

Наиболее широко применяются из этой группы методов исследования: методы хроматографии, спектрофотометрии, спектрофлуориметрии и др., которые выявляют измененные параметры в химическом составе продукта. Так, генетически модифицированные линии сои G94-1, G94-19, G168 имеют измененный жирнокислотный состав, сравнительный анализ которого показал увеличение содержания олеиновой кислоты в генетически модифицированной сое (83,8%) по сравнению с ее традиционным аналогом (23,1%). Применение в данном случае метода газовой хроматографии позволяет выявить генетическую модификацию сои даже в таких продуктах, которые не содержат ДНК и белка, например, рафинированное соевое масло.

Присутствие в продукте нового белка дает возможность применять для определения ГМО иммунологические методы. Они наиболее просты в исполнении, имеют относительно низкую стоимость и позволяют определить конкретный белок, несущий новый признак. В настоящее время разработаны тест-системы, применяя которых можно проводить количественное определение модифицированного белка в продуктах. Технологической основой в подобных тест-системах в большинстве случаев используются методы *иммуоферментного анализа*.

Принцип метода заключается в том, что антиген (АГ) или антитело (АТ), вступающее в иммунную реакцию, метится ферментом и по превращению субстрата ферментом можно судить о количестве вступившего во взаимодейст-

вие компонента реакции АГ – АТ. Чувствительность ИФА чрезвычайно высока и позволяет определять минимальные количества вещества (нанограммы).

Одним из недостатков этого метода при идентификации ГМО является низкая эффективность при оценке продуктов, подвергшихся какой-либо технологической обработке, вызывающей практически полную денатурацию или расщепление молекул модифицированного белка. Возможность определения белка иммуноферментным методом может быть ограничена также уровнем его содержания в продукте.

В большинстве стран мира основным способом определения ГМО в продуктах являются молекулярно-генетические методы, основанные на определении рекомбинантной ДНК и главным образом, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК более стабильна, чем белок, и в меньшей степени разрушается при технологической или кулинарной обработке пищевых продуктов, что делает возможным определение в них ГМО. Объединенный Научный Центр Европейской Комиссии объявил этот метод в качестве стандартного для идентификации ГМО.

В России ПЦР был утвержден Минздравом РФ в качестве основного метода для идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения в пищевых продуктах в 2000 году.

Глава 2

Клеточная инженерия

Клеточная инженерия - совокупность методов, используемых для конструирования новых клеток. Включает культивирование и клонирование клеток на специально подобранных средах, гибридизацию клеток, пересадку клеточных ядер и другие микрохирургические операции по «разборке» и «сборке» (реконструкции) жизнеспособных клеток из отдельных фрагментов.

Клеточная инженерия является одним из основных разделов молекулярной биотехнологии. Под клеточной инженерией в широком смысле понимают культивирование в асептических условиях среды вне организма (*in vitro*) изолированных клеток и тканей растений, животных и микроорганизмов, а также различные манипуляции с ними.

С переходом на культивирование клеток биологи получили мощный инструментарий для изменения наследственности организмов, получения принципиально новых форм, разработки новых технологий в практической медицине и ветеринарии, в генетике животных и растений, в защите растений и повышении плодородия почв, защите окружающей среды и др. Область применения достижений клеточной инженерии сегодня стремительно расширяется.

1. Краткая история. Достижения

Начало клеточной инженерии относят к 1960-м гг., когда возник метод гибридизации соматических клеток. К этому времени были усовершенствованы способы культивирования животных клеток и появились способы выра-

щивания в культуре клеток и тканей растений. Соматическую гибридизацию, т. е. получение гибридов без участия полового процесса, проводят, культивируя совместно клетки различных линий одного вида или клетки различных видов. При определённых условиях происходит слияние двух разных клеток в одну гибридную, содержащую оба генома объединившихся клеток. Удалось получить гибриды между клетками животных, далёких по систематическому положению, например мыши и курицы.

Соматические гибриды нашли широкое применение, как в научных исследованиях, так и в биотехнологии. С помощью гибридных клеток, полученных от клеток человека и мыши, человека и китайского хомячка, была проделана важная для медицины работа по картированию генов в хромосомах человека. Гибриды между опухолевыми клетками и нормальными клетками иммунной системы (лимфоцитами) – так называемые гибридомы – обладают свойствами обеих родительских клеточных линий. Подобно раковым клеткам, они способны неограниченно долго делиться на искусственных питательных средах и, подобно лимфоцитам, могут вырабатывать моноклональные антитела определённой специфичности. Такие антитела применяют в лечебных и диагностических целях, в качестве чувствительных реагентов на различные органические вещества и т. п.

Другое направление клеточной инженерии – манипуляции с безъядерными клетками, свободными ядрами и другими фрагментами, сводящиеся к комбинированию разнородных частей клетки. Эти эксперименты, а также микроинъекции в клетку хромосом, красителей и т. п. про-

водят для выяснения взаимных влияний ядра и цитоплазмы, факторов, регулирующих активность генов, и т. п.

Путём соединения клеток разных зародышей на ранних стадиях их развития выращивают мозаичных животных, или химер, состоящих из двух различающихся генотипами видов клеток. С помощью таких экспериментов изучают процессы дифференцировки клеток и тканей в ходе развития организма.

Ведущиеся уже не одно десятилетие опыты по пересадке ядер соматических клеток в лишённые ядер (энуклеированные) яйцеклетки животных, с последующим выращиванием зародыша во взрослый организм, с конца 20 в. получили широкую известность как *клонирование* животных.

Реконструкция эмбриональных клеток (под этим в первую очередь понимают замену ядра клетки) позволяет вплотную подойти к выяснению механизмов реализации генетической информации. И здесь, в первую очередь, интересны исследования по анализу тотипотентности генома клеток разного уровня дифференцировки или его способности к репрограммированию, возможности получения отцовских и материнских копий (т.е. к клонированию), а также получения межвидовых химерных (или мозаичных) животных и т.д. Реконструкция эмбриональных клеток важна и для глобальной проблемы, поднятой впервые профессором Б. Н. Вепринцевым в 70-е годы такой как реализация генетической информации криоконсервированных геномов исчезающих видов животных.

Преимущество клеточной инженерии в том, что она позволяет экспериментировать с клетками, а не с целыми

организмами. Методы клеточной инженерии в медицине, сельском хозяйстве или биотехнологии часто применяют в сочетании с генной инженерией.

Методы клеточной инженерии перспективны и в животноводстве. Уже накоплен большой опыт культивирования соматических клеток животных *in vitro*, разработаны оптимальные среды и режимы культивирования, отработаны способы длительного хранения клеток при низких температурах. Как уже было сказано, активные исследования проводятся и по культивированию генеративных клеток. Разработка этих методов создает прочную основу для развертывания теоретических и прикладных работ по клеточной инженерии сельскохозяйственных животных, которые будут иметь все возрастающее народнохозяйственное значение.

2. Трансгенез

Трансгенез - искусственный перенос гена или группы генов из одного организма в другой и создание условий для их экспрессии.

Трансгенез – один из процессов в молекулярной биотехнологии, объединяющий генную и клеточную инженерию в одно целое (биоинженерия), т.к. предусматривает использование методов как генной, так и клеточной инженерии.

Впервые о попытке трансформировать животное сообщил Venoit с соавторами (1957), описав фенотипическое изменение уток пекинской породы при введении им экзогенной ДНК интроперитонеально (внутрибрюшинно).

В 1974 г. Jaenisch и Mintz впервые получили линию мышей, несущих чужеродный ген. Они описали схему эксперимента по введению чужеродной ДНК вируса SV40 в бластоцисты, которые помещали в матку специально подготовленных самок. Из таких эмбрионов развивались нормальные взрослые мыши, часть из которых содержала в своем геноме множественные копии ДНК вируса SV40.

В 1975 г. Mintz и Illmensee продемонстрировали возможность введения чужеродных генов в организм животного, используя клетки тератокарциномы (ТСС) мыши.

В 1980 г. Gordon с соавторами опубликовали первый отчет о получении трансгенной мыши путем микроинъекции в пронуклеус. Процесс трансформации мышинного генома в чужеродной ДНК путём микроинъекции в пронуклеус назвали «трансгенезом». «Трансгенное животное» они определили как животное, имеющее ген (или гены) включенный в их геном с человеческим участием искусственно, а сам ген или участок двунитевой ДНК был назван «трансгеном».

Выделяют следующие основные этапы в создании трансгенного организма:

1. Получение изолированную целевую последовательность ДНК (ген);
2. На основе данной последовательности конструирование специального трансгенного вектора;
3. Внедрение вектора в модифицируемый организм;
4. Выявление и отбор модифицированных особей;

Методы выделения генов и конструирования генетических векторов идентичны тем, что применяются в генной инженерии.

Внедрение вектора в модифицируемый организм

В настоящее время известны различные способы внедрения экзогенной ДНК в геном животных. Наиболее широкое применение в практике получили:

- метод микроинъекции ДНК в пронуклеус зиготы;
- перенос генов ретровирусами;
- перенос трансформированных ядер генеративных и соматических клеток;
- искусственное оплодотворение с использованием генетически модифицированных сперматозоидов (ICSI);
- электропорация.

Каждый из методов имеет свои достоинства и недостатки. Выбор того или иного метода зависит от цели конкретного исследования.

Перенос генов с использованием ретровирусных векторов – достаточно результативный способ передачи ДНК в эмбриональные клетки.

Ретровирусы – семейство эукариотических РНК-содержащих вирусов. Как уже было сказано в предыдущих главах, ретровирусная РНК попадая внутрь клетки, превращается в ДНК путем обратной транскрипции, которая встраивается в геном клетки (провирус). Таким образом, ретровирус своего рода естественно-природный генетический вектор.

В молекулярной биотехнологии наиболее часто используются ретровирусные векторы на основе ретровирусов мыши типа С (вирус лейкемии мыши). Такие векторные системы состоят из двух компонентов: векторной конструкции и линии клеток-упаковщиц. В векторной кон-

рукции (провирусная ДНК) гены, кодирующие структурные белки ретровируса (gag, pol, env), замещаются чужеродными генами.

Преимуществом применения такого подхода является тот факт, что до 100% обработанных эмбрионов могут быть успешно инфицированы ретровирусом. К недостаткам относят ограниченную емкость таких систем (размер вставки – не более 8 т.п.н.), а также возможное подавление экспрессии трансгенов и вероятность активации клеточных онкогенов (Эрнст, Зиновьева, 2002).

Другим способом получения трансгенных животных является использование трансформированных генными конструкциями клеточных линий. С этой целью могут быть использованы линии, как стволовых, так и соматических клеток. Преимуществом этого подхода является возможность тестирования интеграции трансгена непосредственно в культуре клеток и возможность оценки экспрессии трансгенов. Таким образом, можно получать только трансгенное потомство, отбирая для пересадки ядер только те клеточные линии, в которых трансген транскрипционно и трансляционно активен.

В качестве природного вектора, доставляющего ДНК в клетки, могут быть использованы сперматозоиды. Сперматозоиды могут поглощать экзогенную ДНК и аккумулировать её в ядре. Очевидным преимуществом является возможность использования сперматозоидов после криоконсервации и длительного культивирования. Однако, механизм интеграции экзогенной ДНК в геном сперматозоидов не до конца установлен.

Ещё одним способом внедрения экзогенной ДНК в клетки является метод электропорации, впервые примененный в 1982 г. Т. Вонгом и Е. Нейманом с сотрудниками. Суть подхода заключается в кратковременном (5 – 20 мс) воздействии электрического поля высокой напряженности (1 – 15 кВ/см) на бислойную липидную мембрану, что приводит к образованию в ней пор. Время существования и размер пор позволяют таким макромолекулам, как ДНК, войти в клетку под действием осмотических сил. Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, а также концентрация экзогенной ДНК и количество клеток-реципиентов подбираются экспериментально. Электропорация является наиболее простым, эффективным и хорошо воспроизводимым методом введения молекул ДНК в клетки.

Классическим же методом трансформации животных является метод микроинъекции.

Перенос генов методом микроинъекции ДНК в пронуклеус зиготы — основной метод получения трансгенных животных.

Задачу переноса генов лабораторным млекопитающим (мышам) впервые удалось разрешить Дж. Гордону в 1980 году. Было доказано, что при инъекции чужеродных генов в мужской пронуклеус зиготы они интегрируются в хромосоме реципиента, а затем в ходе развития эмбриона и новорожденного животного распределяются по соматическим и половым клеткам.

Суть метода заключается в следующем. Из яйцевода самки извлекают зиготы, освобождают их от окружающих фолликулярных клеток, инкубируют в специальных средах

под объективом микроскопа. Зиготу фиксируют микропипеткой, закрепленной на микроманипуляторе. С противоположной стороны подводят инъекционную микропипетку, в которой находится раствор с геном.

Для инъекции чужеродной ДНК в мужской пронуклеус зиготы используют плазмиды с конструкциями, включающими промотор и структурный ген. В мужской пронуклеус инъецируют около 1 пиколитра буферного раствора с рекомбинантной ДНК, содержащей до 100 и более копий гена. Как правило, 60-80% реконструированных зигот хорошо переносят микроманипуляции. После оценки жизнеспособности зиготы трансплантируют самке-реципиенту другой генетической линии.

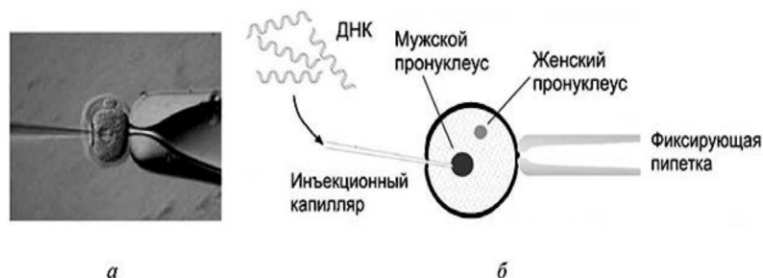


Рис. 24. Микроинъекция экзогенной ДНК в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки млекопитающих под микроскопом (а) и схема эксперимента (б).

Технология получения трансгенных сельскохозяйственных животных путем микроинъекции чужеродных клонированных генов в пронуклеус зиготы включает следующие основные стадии:

- гормональная подготовка доноров-самок;

- выделение из яйцевода оплодотворенных яйцеклеток на стадии двух пронуклеусов и визуализация пронуклеусов;
- микроинъекция в пронуклеус зиготы раствора ДНК;
- трансплантация инъецированных зигот;
- выявление интеграции чужеродной ДНК.

Основные направления использования трансгенных животных

В биотехнологической отрасли можно выделить следующие направления использования трансгенных животных:

- продукция белков и ростовых факторов, используемых в науке и медицине;
- решение ксенотрансплантационных (межвидовая трансплантация) проблем;
- сельскохозяйственные и пищевые нужды;
- моделирование заболеваний и изучение фундаментальных биологических процессов.

Получение трансгенных особей животных, которых можно использовать в качестве продуцентов для производства лекарственных белков человека, является крупнейшим шагом в становлении фармацевтической промышленности нового типа. Использование для получения лекарственных белков человека животных-продуцентов снимает множество вопросов. Это экологически чистое неэнергоемкое производство, дающее возможность контролировать объем выпускаемых препаратов в зависимости от требова-

ний рынка. Лидирующее положение в этой области занимает биотехнологические компании США.

В нашей стране получены свиньи, несущие дополнительный ген соматотропина. Они не отличались по темпам роста от нормальных животных, но изменение обмена веществ сказалось на содержании жира. У таких животных ингибировались процессы липогенеза и активировался синтез белка. Такие трансгенные свиньи были созданы для изучения цепочки биохимических превращений гормона, а побочным эффектом явилось укрепление иммунной системы.

Самая мощная белоксинтезирующая система находится в клетках молочной железы. Если поставить гены чужих белков под контроль казеинового промотора, то экспрессия этих генов будет мощной и стабильной, а белок будет накапливаться в молоке. Уже получены трансгенные коровы, в молоке которых содержится человеческий белок лактоферрин. Этот белок планируют применять для профилактики гастроэнтерологических заболеваний у людей с низкой иммунорезистентностью. Таким категориям людей относятся больные СПИДом, недоношенные младенцы, больные раком, прошедшие радиотерапию и др. Особенно большие успехи достигнуты в этой области в КНР.

В Англии созданы трансгенные овцы, молоко которых содержит фактор свертывания крови. В России получены кролики, выделяющие γ -интерферон, эритропоэтин. Были получены овцы, свиньи, рыба и кролики – с увеличением массы тела на 30-50% .

Трансгенных животных получают и в ксенотрансплантационных целях. Одним из излюбленных доноров

органов являются свиньи, так как имеется анатомическое сходство органов и сходство иммунологических свойств. Реакции отторжения при трансплантации является наиболее значимой проблемой и имеют сложный молекулярный механизм развития. Одним из сигналов для атаки организма на чужой орган являются белки, локализованные на внешней поверхности мембраны. У трансгенных свиней эти белки заменены на человеческие.

В научно - исследовательских институтах ведутся исследования по трансгенезу животных с целью получения тканей для пересадки человеку, по хирургическому клонированию путем деления эмбрионов в раннем возрасте и т.д.

Еще одно направление развития трансгенеза – получение устойчивых к болезням животных. Животноводство держится на вакцинах, так как селекция ведется преимущественно на хозяйственно ценные признаки – шерстистость, молочность и т. д. Повышение устойчивости – дело генных инженеров. К защитным белкам относятся интерфероны, поэтому ген интерферона встраивали различным животным. Трансгенные мыши получили устойчивость, они не болели или болели мало, а вот у свиней такого эффекта не обнаружено.

Другое направление – введение генов, кодирующих антисмысловую РНК. Для животноводства острой проблемой являются лейкозы, вызываемые РНК-вирусами. Трансгенные кролики, несущие гены, отвечающие за присутствие в клетке антисмысловой РНК, были устойчивы к лейкозам.

Трансгенных животных можно использовать для изучения наследственных заболеваний мозга и нервной системы. Гены болезни Альцгеймера (отложение белка β -амилоида приводит к образованию характерных бляшек) и гены, отвечающие за развитие эпилепсии, болезней мозга вводятся в геном нормальных животных. Так получают трансгенных животных-моделей, на которых можно испытывать различные терапевтические приемы.

Трансгенных животных стали использовать для исследования воспалительных и иммунологических заболеваний человека, например, ревматоидного артрита. Моделируются болезни, связанные с липидным обменом.

Трансгенные мышцы являются модельными системами для изучения болезней человека и тест – системами для изучения возможности синтеза продуктов, представляющие интерес для медицины. Такими болезнями являются: болезнь Альцгеймера, артрит, мышечная дистрофия, образование опухолей, гипертония, дистрофия эндокринных желез и др.

3. Клонирование – способ создания новых организмов.

5 июля 1996 года, в Шотландии появилась на свет овечка Долли – первое теплокровное животное, полученное из генетического кода другого взрослого существа путем клонирования. *Клонирование в биологии* – это получение точных копий организма или другого объекта, например, клетки или гена. Появление Долли стало настоящим прорывом в клеточных технологиях, революцией в генной

инженерии. На сегодняшний день проблема клонирования млекопитающих является одной из самых актуальных в мировой науке.

Клонирование – получение идентичных потомков при помощи бесполого размножения. Полученные организмы похожи не только внешне, но и генетический код, заложенный в них, одинаков.

Метод клонирования возник в результате исследований по доказательству того, что ядра зрелых клеток содержат всю информацию необходимую для кодирования всех признаков организма, специализация каждой клетки обусловлена с началом или прекращением функционирования определённых генов.

История клонирования начинается с экспериментов немецкого эмбриолога Ханса Дриша, который доказал «возможность искусственного получения близнецов». Он разделив клетки двухклеточного зародыша морского ежа, получил два генетически идентичных организма.

Первые успешные опыты по трансплантации ядер клеток тела организма в яйцеклетку осуществили в 1952 году Бриге и Кинг на экспериментах с амёбами. В 1976 году Дж. Гордон доказал возможность клонирования на лягушках, а в 1979 году англичанин Виладсен разработал метод получения однояйцевых близнецов из эмбрионов овцы и коровы.

Способы и методы клонирования

В основе технологии клонирования, так или иначе, лежит способность клетки развиваться только с материнским диплоидным набором хромосом. Заставить клетку

развивать такую способность можно двумя способами: *хирургическим* и *“терапевтическим”*.

Хронологически второй метод изобретён намного раньше. Сто лет назад зоолог Московского университета А. Тихомиров доказал, что яйца тутового шелкопряда под воздействием различных химических и физических реакций могут развиваться без оплодотворения. Такое развитие было названо партеногенезом.

Клонировать млекопитающих можно, как упоминалось, и другим способом – хирургическим. Он основан на замене гаплоидного ядра яйцеклетки на диплоидное ядро, взятое из клеток эмбрионов. Эти клетки ещё не дифференцированы, то есть не началась закладка органов, поэтому их ядра легко заменяют функцию диплоидного ядра только что оплодотворённой клетки. Таким методом в США (1952) У. Р. Бриггс и Т. Дж. Кинг, в Англии Д. Б. Гордон (1960) получили генетические копии лягушки, а в 1997 году шотландец И. Уилмут получил хирургическим путём знаменитую овцу Долли - генетическую копию матери.

Технология хирургического клонирования состоит в том, что из яйцеклетки при помощи микрохирургической операции удаляется ядро и вместо него вводится ядро соматической клетки другой особи (донора), в которой содержатся гены только донорского организма. Различия в геномах родительского организма и его клона составляют не более 0,1%. Второй вариант технологии – это энуклеация соматической клетки и введение в нее ядра яйцеклетки. В связи с тем, что различия, хоть и минимальные, в строгом смысле слова клон не является абсолютно идентичным родительскому организму.

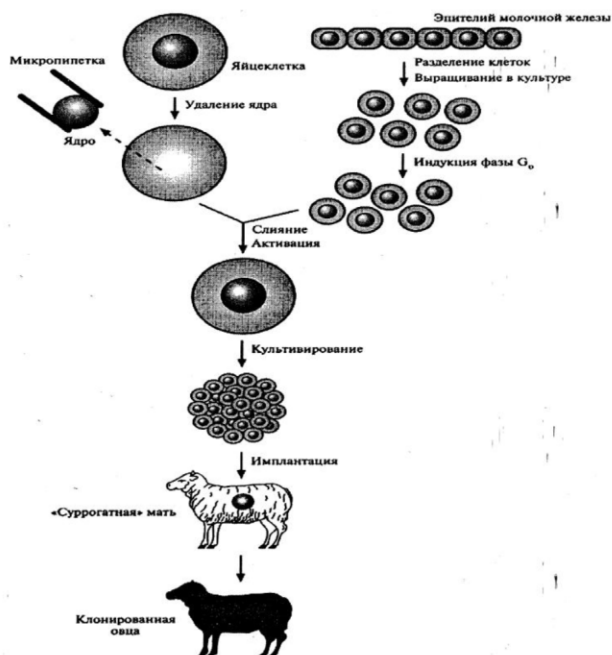


Рис. 25. Клонирование овцы методом переноса ядра

Ученые из университета штата Висконсин опробовали новую методику клонирования млекопитающих, отличную от той, что применялась учеными из Рослингского института, вырастившими Долли. Они в качестве основного исходного материала использовали яйцеклетку коровы, у которой генетический материал заменили на молекулы ДНК других клонируемых животных - свиньи, крысы, овцы или обезьяны. При этом источником наследственного материала служили клетки тканей взрослых особей, взятые, например, из свиного или крысиного уха. После искусственного оплодотворения из коровьей яйцеклетки, по-

лучившей новую генетическую информацию, развивался зародыш другого млекопитающего - копия генетического донора. Таким образом, ученым удалось благополучно вырастить в лабораторных условиях эмбрионы свиньи, крысы, овцы и обезьяны.

Разработчики метода уверены, что их исследования имеют важное значение для развития генной инженерии и изучения возможностей генетического донорства. Данная методика клонирования в будущем сможет помочь сохранению исчезающих и редких видов животных.

Виды клонирования

В настоящее время выделяют два вида клонирования: *репродуктивное и терапевтическое*. В результате репродуктивного клонирования образуется новый целостный организм, который является генетической копией другого организма – клон.

Терапевтическое клонирование – это технология клонирования с целью получения эмбриональных стволовых клеток для научных исследований и использования в терапии различных заболеваний человека. В процессе терапевтического клонирования эмбрион не переносится для дальнейшего развития в полость матки женщины, а используется в качестве объекта научных исследований и получения стволовых клеток.

Зигота является тотипотентной, т.е. из любой ее клетки может при соответствующих условиях развиваться зародыш. На стадии бластоцисты образуются плюрипотентные клетки, из которых в дальнейшем формируются все органы и ткани организма. В процессе терапевтического клониро-

вания эмбрион неизбежно уничтожается после образования первичной «полоски» («ствола») клеток, т.к. их дальнейшее развитие происходит в различных условиях искусственной среды в соответствии с тем, какую ткань предполагается получить.

Технология репродуктивного клонирования широко применяется в исследовательских целях на животных. К настоящему времени накоплен обширный опыт по клонированию животных разных видов (грызуны, кошки, кролики, свиньи, телята и др.).

Наиболее перспективным направлением в клеточной инженерии является клонирование животных с использованием методов генной инженерии. Введение в эмбрион новой ДНК позволяет получать животных с новыми свойствами их организмов. Эти свойства могут быть использованы в медицине для лечения различных заболеваний, трансплантации, в фармацевтической и пищевой промышленности. Например, в 1997г. биотехнологическая компания PPL Therapeutics Inc. совместно с Розлинским институтом клонировала овцу по кличке Поли из генетически измененной зародышевой клетки. Молоко клонированного животного содержало белок, вызывающий свертывание крови человека, который может быть использован для лечения гемофилии.

Возможности использования технологий терапевтического и репродуктивного клонирования выявили целый ряд этических - философских, социально - правовых и других проблем, связанных со спецификой каждого из этих видов клонирования.

Применение технологии репродуктивного клонирования на человеке вызвало наибольшее количество возражений, споров и дискуссий различного уровня и направлений. Эксперименты по клонированию эмбрионов человека перевели данную проблему из области биомедицины в область этико-правовых, социально-политических и религиозных проблем мирового значения. В настоящее время перспектива клонирования человека рассматривается как потенциальная угроза для самобытности человека, как в физическом, так и в духовно-психологическом плане.

Правовой аспект проблемы клонирования нашел широкое отражение в ряде международных и государственных документов многих стран. На международном уровне проблема репродуктивного клонирования человека рассматривалась несколькими специализированными учреждениями системы Организации Объединенных Наций. Во Всеобщей Декларации о геноме человека и правах человека в области биомедицины (ВМА), принятой в 1997 г. и одобренной Ассамблеей ООН в 1998 г., провозглашено, что геном человека «знаменует собой достояние человечества» и признается «неотъемлемое достоинство и разнообразие» всех представителей человеческого рода. В данном документе клонирование человека признается противоречащим человеческому достоинству. В разделе «Исследования, касающиеся генома человека» сказано: «Не допускается практика, противоречащая человеческому достоинству, такая, как практика клонирования в целях воспроизводства человеческой особи».

Наиболее вероятным и перспективным направлением в использовании технологии клонирования является кло-

нирование домашних животных с целью удовлетворения потребности населения в мясных продуктах питания, терапевтическое клонирование органов тела человека для последующей их трансплантации и репликация клеток для научных исследований.

4. Стволовые клетки

В 1999 году журнал «Science» признал открытие эмбриональных стволовых клеток третьим по значимости событием в биологии после расшифровки двойной спирали ДНК и программы «Геном человека». Стволовые клетки — это иерархия особых клеток живых организмов, каждая из которых способна впоследствии дифференцироваться особым образом, т.е. получать специализацию и далее развиваться как обычная клетка.

Все органы образуются из одной и той же стволовой клетки, но почему-то в одном месте она превращается в клетку крови, в другом — в клетку жировой или костной ткани, а в третьем из нее появляется хрящевая клетка — хондроцит и т.д. Природа использует огромное количество биологически активных веществ в том или ином сочетании, чтобы дифференцировать стволовые клетки в разных направлениях и создавать из них разные органы. Разгадка этого природного кода — самая сложная задача, которой занимаются ученые многих стран мира.

Клетки, выделенные из эмбрионов на стадии бластоцисты, могут пролиферировать в культуре, сохраняя способность к дифференцировке в любые типы клеток, в т.ч. и в клетки зародышевой линии, при введении в другой эмбрион на стадии бластоцисты. Такие клетки называются

плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками (ES – клетки).

Они являются наиболее универсальными и характеризуются следующими основными свойствами:

1. Тотипотентность — способность образовывать любую ткань организма.

2. Хоуминг — способность стволовых клеток, при введении их в организм, находить зону повреждения и фиксироваться там, исполняя утраченную функцию.

3. Теломеразная активность.

4. Наличие в цитоплазме мРНК всех генов, которые отвечают за раннее развитие зародыша.

В различных органах и тканях взрослого организма существуют частично созревшие стволовые клетки, готовые быстро дозреть и превратиться в клетки нужного типа. Дифференцировку могут запускать как внутренние причины, так и внешние. Стволовые клетки таят в себе невиданные возможности: от регенерации поврежденных органов и тканей до лечения заболеваний, не поддающихся лекарственной терапии. Стволовые клетки взрослого организма обеспечивают нормальное развитие человека, но клетки взрослых не такие универсальные как клетки эмбриона. Они могут стать таким типом клеток, который сохраняет специфику ткани, из которой были выделены.

По данным Международного общества по исследованию стволовых клеток (ISSCR), существует два типа стволовых клеток. Первый и самый распространенный вид носит название гемопоэтических стволовых клеток, которые образуют все типы кровяных клеток в организме. Вторая категория стволовых клеток у взрослых носит название

стромальных стволовых клеток костного мозга или мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Хранилищем стволовых клеток организма служит костный мозг, где стволовые клетки находятся в своеобразной нише в окружении стромальных клеток, которые участвуют в передаче регуляторных сигналов.

Стволовые клетки, хотя и в небольшом объёме, можно найти и в циркуляционной (так называемой периферической) крови.

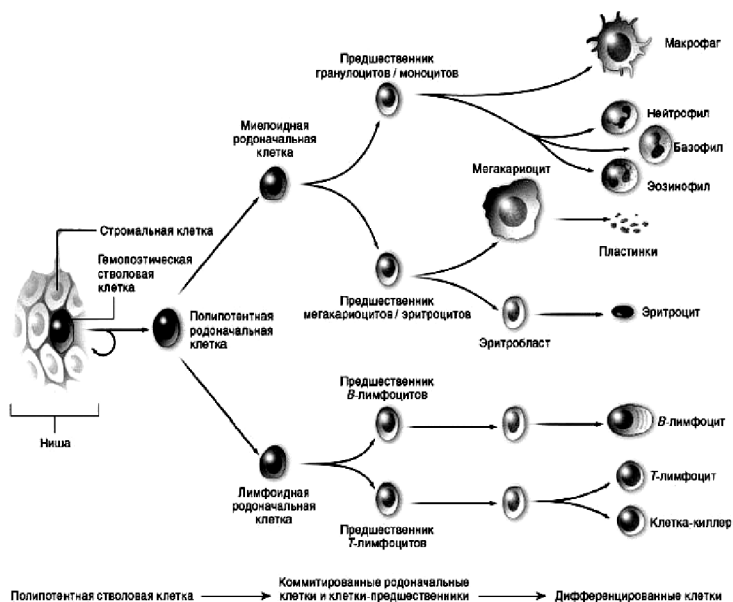


Рис. 26. Родословное дерево клеток крови.

Перепрограммирование соматических клеток

Исследованиями в области молекулярной биотехнологии последних лет доказано возможность изменения процесса дифференциации клеток. Если до недавнего вре-

мени считали, что процесс развития оплодотворенной яйцеклетки происходит поэтапно с постепенной утратой плюрипотентности, то японский ученый Синъя Яманака с соавторами (2006) установили возможность превращения дифференцированных клеток в стволовые, то есть в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) или IPS (induced pluripotent stem cells).

Безусловно, это открытие стало величайшим достижением в клеточной инженерии, и не случайно, Синъя Яманака в 2012 году был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине.

Сегодня технология Яманаки дает возможность из специализированных клеток взрослого организма (чаще всего из фибробластов кожи) получать плюрипотентные клетки, наделенные возможностями развиваться в клетки разных тканей и органов. Для этого в них нужно внедрить четыре гена - Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мус., которые обычно работают в эмбриональных стволовых клетках. Эти гены перепрограммируют клеточный геном, возвращая клетку в эмбриональную стадию и в последующем из них можно получить любой тип клеток. Так, Д. Шриваставе получил сердечные миоциты из клеток кожи, а М.Вернига из клеток кожи нейроны (2010 г.) и др.

Технология отработана, но у нее есть недостатки: она довольно медленна и неэффективна для того, чтобы ее можно было использовать в практической медицине. О радикальном ее совершенствовании доложили ученые из Израиля под руководством доктора Якуба Ханна. Они совершили настоящий прорыв в технологии, добились того, что все исходные фибробласты стали превращаться в

ИПСК. Этот прорыв чрезвычайно важен как для целей медицины, так и для лучшего понимания самого процесса перепрограммирования.

До сего времени перепрограммирование зрелых фибробластов в стволовые клетки занимало свыше 4-х недель. Сложность состоит еще и в том, что этот процесс происходит несинхронно в разных клетках. Наконец, выход конечного продукта, то есть ИПСК, не превышает 1%. Причина, не дающая клеткам эффективно менять свою судьбу, оказалась в одном белке под названием MBD-3.

Данный белок всегда присутствует в любой клетке на любой стадии ее развития, но до сих пор ученые не знали его функций. Как выяснили исследователи, единственное время, когда белка MBD-3 нет в клетке, это первые три дня после оплодотворения, то есть те самые первые дни развития зиготы, когда она начинает делиться, образуя бластулу и которая образована эмбриональными стволовыми клетками. Уже, начиная с четвертого дня развития, в клетках появляется белок MBD-3, и они постепенно утрачивают плюрипотентность и их развитие направляется по тому или иному пути. В дальнейшем клетки образуют три зародышевых листка — эктодерму, энтодерму и мезодерму. Биологи предположили, что именно белок MBD-3 противостоит плюрипотентности. Они удалили его из клеток, в результате скорость и эффективность их перепрограммирования резко повысились. Необходимое для этого время сократилось с четырех недель до восьми дней. Клетки начали испытывать превращение синхронно. И его эффективность приблизилась к 100%.

5. Моноклональные антитела.

Как известно, возникновение клеточной инженерии связано с разработкой технологий гибридизации соматических клеток. В настоящее время создание гибридной технологии можно считать наиболее яркой страницей не только клеточной инженерии, но и молекулярной биотехнологии в целом. К этому времени усовершенствованы способы культивирования животных клеток и появились способы выращивания в культуре клеток и тканей растений.

Под клеточной инженерией в основном понимают метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции.

Культура клеток — метод сохранения жизнеспособности клеток вне организма в искусственно созданных условиях питательных сред. Для культивирования могут быть использованы клетки различных органов, лимфоциты, фибробласты, эмбрионы, клетки почек животных и человека, раковые клетки человека и т. д. *Культуры, приготовленные непосредственно из тканей организма, называются первичными.* В большинстве случаев клетки первичной культуры можно перенести из культуральной чашки и использовать для получения вторичных культур, которые можно последовательно перевивать в течение недель и месяцев.

Одним из важнейших достижений гибридной технологии является разработка методики получения моноклональных антител.

При введении антигена в организм возникает большое семейство различных антител, направленных к разным его детерминантам. Однако, иногда требуется только определённый вид антител, специфичных лишь к одной детерминанте антигена и имеющих одни и те же характеристики.

Моноклональные антитела – это антитела строго определённой специфичности, продукт одного клона клеток. Моноклональные антитела гомогенны как по специфичности, так и по физико-химическим свойствам. Моноклональное антитело связывается только с одной антигенной детерминантой на молекуле антигена. В природе почти никогда не наблюдается истинный моноклональный ответ.

Получение моноклональных антител стало возможным благодаря работам Георга Келера и Цезаря Мильштейна, которые в 1984 г. стали лауреатами Нобелевской премии.

Г. Келлер и Ц. Мильштейн получили гибридные клетки из лимфоидной опухоли (миелома) и нормального лимфоцита. Гибридные клетки имели часть хромосом нормального лимфоцита и часть - от опухоли. Следовательно, гибридома наследовала от нормальной клетки способность к синтезу антител, а от опухолевой клетки – способность к неограниченному числу делений.

Таким образом, гибридная технология получения моноклональных антител - слияние лимфоцитов тканей (чаще селезенки) организмов, предварительно иммунизированных определенным антигеном, с раковыми клетками, способными к бесконечному делению.

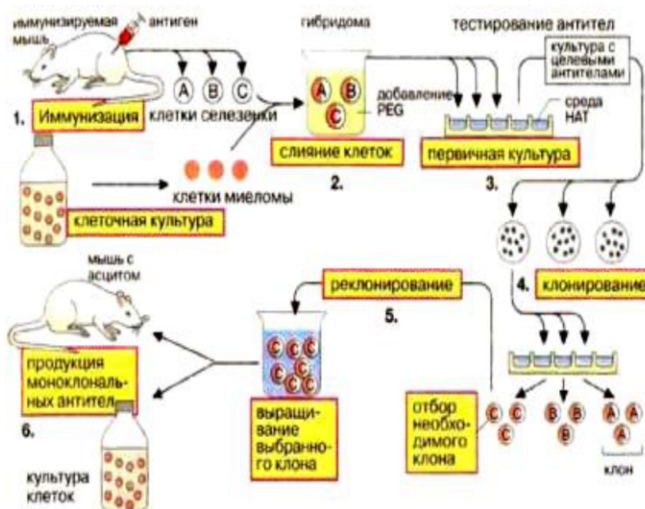


Рис. 27. Этапы получения моноклональных антител.

Гибридомы - бессмертные клоны клеток лимфоидной ткани, синтезирующие моноклональные антитела.

Моноклональные антитела, продуцируемые одним клоном обладают следующими свойствами:

- высокоспецифичны и специфичность направлена только к заданной антигенной детерминанте;
- идентичны по аллотипу и идиотипу, а также по аффинности и физико-химическим характеристикам.

Стабильные культуры гибридом способны продуцировать моноклональные антитела в неограниченном количестве. Благодаря своим уникальным свойствам моноклональные антитела успешно используются для решения многих актуальных задач биологии и медицины. Сегодня более 20% разрабатываемых биофармацевтических препаратов являются продуктами гибридомной технологии.

Получение и использование моноклональных антител — одно из существенных достижений современной иммунологии. С их помощью можно определить любое иммуногенное вещество:

1) антигены, определяющие гистосовместимость и дифференцировку;

2) дифференцировочные, опухолевые и другие антигены клеточной поверхности, которые лишены полиморфизма и неиммуногенны в аллогенных системах, но распознаются при иммунизации;

3) вирусные и бактериальные антигены;

4) единичные антигенные детерминанты разнообразных белков, нуклеиновых кислот и др.

Моноклональные антитела можно использовать для диагностики рака и определения локализации опухоли, для диагностики инфаркта миокарда. Можно использовать моноклональные антитела для определения пола у крупного рогатого скота на предимплантационной стадии развития, а также для стандартизации методов типирования тканей при трансплантации органов, при изучении клеточных мембран, для построения антигенных карт вирусов, возбудителей болезней.

В медицине на основе моноклональных антител разработано большое количество диагностических систем для различных заболеваний (инфекционных, онкологических и др.), активно разрабатываются и лекарственные препараты, например, противоопухолевые препараты, антицитокиновые антитела и др.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова З.И. Введение в генетическую инженерию. Учебное пособие для самостоятельной работы студентов. Казань. КФУ. -2008. – 168с.
2. Вечканов Е. М., Сорокина И. А. Основы клеточной инженерии: Учебное пособие. Ростов-на-Дону. 2012. – 136с.
3. Глик Б., Дж.Пастернак. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Москва «Мир». 2002.-589С.
4. Тихонов И.В. Биотехнология. Санкт – Петербург. 2005.-792С.
5. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология. Москва, 2003.-469С.
6. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Новосибирск. – 2004.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Биотехнология – история становления как наука.
2. Молекулярная биотехнология – основные направления и их характеристика.
3. Генетическая инженерия – история развития, основные методы и объекты генной инженерии.
4. ДНК – как носитель генетической информации.
5. Ген, геном, структура генома.
6. Этапы реализации генетической информации в клетке.
7. Секвенирование ДНК. Метод Сенджера.
8. Ферменты генной инженерии. Рестриктазы. Особенности механизма действия.
9. Методы изучения генетического материала клетки. Рестрикционный анализ. Методы электрофореза. Методы гибридизации и др.
10. ПЦР. Основные принципы. Методика постановки.
11. Нокаутирование генов – как один из основных методов изучения генома.
12. Современные методы генодиагностики и генотерапии.
13. Молекулярные механизмы репарации ДНК.
14. Основные этапы получения рекомбинантных молекул ДНК.
15. Способы получения генов.
16. Генетический вектор. Виды и требования к генетическим векторам.
17. Методы внедрения вектора в клетку.

18. Генетическая инженерия растений. Основные этапы и её задачи.
19. Трансформация растений с помощью агробактерий.
20. Генетически модифицированные организмы. Способы их получения.
21. Методы идентификации ГМ-продуктов.
22. Клеточная инженерия – история развития, основные методы и объекты изучения.
23. Трансгенез. Способы получения трансгенных животных. Основные этапы.
24. Технология трансгенеза методом микроинъекций в пронуклеус.
25. Ретровирусные векторы в трансгенезе и их значение.
26. Антисмысловая РНК. Введение генов кодирующих антисмысловую РНК как новый подход в генной инженерии.
27. Клонирование – как способ создания новых организмов.
28. Способы и методы клонирования. Виды клонирования.
29. Стволовые клетки. Значение для молекулярной биотехнологии.
30. Перепрограммирование соматических клеток.
31. Получение гибридом – как достижение клеточной инженерии.
32. Моноклональные антитела. Технология получения.
33. Моноклональные антитела и их значение в иммунологии, клинической лабораторной практике и в других областях медицины.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
ГЛАВА 1. Генетическая инженерия	8
1. Краткая история. Достижения	8
2. ДНК – носитель генетической информации	12
<i>Основные отличия между ДНК и РНК (15); структурная организация нуклеиновых кислот (14); структура гена, особенности генома эукариот (19); реализация генетической информации в клетке (23).</i>	
3. Ферменты генной инженерии	28
<i>Рестриктазы (29); ДНК-полимеразы (32); обратная транскриптаза или ревертаза (34); ДНК-лигазы (35); нуклеазы (36).</i>	
4. Методы изучения генома	37
<i>Секвенирование нуклеиновых кислот (37); рестрикционный анализ (49); полимеразная цепная реакция (50); методы гибридизации (53); генная дактилоскопия (55); нокаутирование генов (57);</i>	
5. Методы генодиагностики и генотерапии	63
<i>Репарация ДНК (70), редактирование генома (75), система редактирования CRISPR/Cas9 (76), система редактирования TALEN (81).</i>	
6. Алгоритм создания генноинженерного продукта	83
<i>Получение генов (84); генетический вектор (87); конструирование рекомбинантных ДНК (98); введение рекомбинантных молекул в клетки (102).</i>	
7. Генноинженерные продукты	105
8. Генетическая инженерия растений	110
<i>Трансформация растительных клеток (112).</i>	
9. Генетически модифицированные продукты	120

Методы идентификации ГМО (122).

ГЛАВА 2. Клеточная инженерия 125

1. Краткая история. Достижения 125

2. Трансгенез 128

Внедрение вектора в модифицируемый организм (130); основные направления использования трансгенных животных (134).

3. Клонирование – способ создания новых организмов 137
Способы и методы клонирования (138); виды клонирования (141).

4. Стволовые клетки 144
Перепрограммирование соматических клеток (146).

5. Моноклональные антитела 149

Рекомендуемая литература 153

Предметный указатель 154