

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

М.Р.ШАРИПОВА

КУРС ЛЕКЦИЙ ПО ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Учебное пособие

Казань 2015

Печатается по решению Учебно-методической комиссии Института

Фундаментальной Медицины и Биологии КФУ

Протокол № 1 от 9.09.14

УДК 579.6

ББК28.4

Автор:

д.б.н., проф. М.Р.Шарипова

Рецензенты:

Д.б.н., проф. кафедры биохимии и биотехнологии

К(П)ФУ **Т.В.Багаева**

К.б.н., доцент каф.микробиологии Казанской государственной медицинской

академии **Л.В.Кипенская**

Курс лекций по генетической инженерии: учебное пособие /

М.Р.Шарипова. – Казань: К(П)ФУ, 2015. -114с.

Учебное пособие основано на материале, который используется для чтения курса лекций по генетической инженерии студентам, обучающимся по биологическим специальностям. Изложены стратегия молекулярного клонирования, типы молекулярных векторов, современные методы получения рекомбинантных ДНК, амплификации и секвенирования. Большое внимание уделено практическому применению достижений генной инженерии для получения лекарственных средств, вакцин, инсектицидов, генной терапии, получению трансгенных растений и животных.

Учебное пособие может использоваться в учебном процессе, а также быть полезным для тех, кто хочет специализироваться в области генной инженерии.

© Шарипова М.Р., 2015

Содержание

Введение	4
Стратегия молекулярного клонирования	6
Типы молекулярных векторов	10
Векторные молекулы ДНК	16
Характеристика хозяев для векторов с чужеродной ДНК	26
Клонирование структурных генов эукариот	28
Блоттинги	29
Секвенирование ДНК	30
Система полимеразной цепной реакции	42
Направленный мутагенез молекул ДНК <i>in vitro</i>	48
Геномы микроорганизмов	52
Генетическая инженерия дрожжей	53
Генетическая инженерия бактерий	61
Генетическая инженерия бактерий	81
Генетическая инженерия животных	95
Генетическая инженерия человека	103
Основная литература	114

Введение

Генная инженерия относится к новому разделу экспериментальной молекулярной биологии и направлена на конструирование *in vitro* функционально-активных генетических структур - рекомбинантных ДНК. Появление новой методологии расширило экспериментальные границы молекулярной биологии, поскольку позволило манипулировать с чужеродной ДНК и исследовать ее функционирование в гетерологичных системах. Такой подход обогатил теорию знаниями о закономерностях механизма передачи генетической информации и послужил основой для создания принципиально новых биотехнологий. По сути, генно-инженерные методы совершили революцию в биологической науке.

Цель генной инженерии – выяснение механизмов функционирования генетического аппарата. *Практические задачи* - создание генно-инженерных штаммов бактерий для получения лекарственных средств, диагностикумов, вакцин; создание трансгенных растений с заданными свойствами; создание трансгенных животных для практических целей; разработка методов генной терапии человека.

Фундаментом для развития генной инженерии служат достижения в молекулярной биологии, микробиологии, биохимии и генетике. Достижения в этих базисных областях науки позволили изолировать дискретные участки ДНК – гены. До создания методологии рекомбинантных ДНК все рассуждения о природе гена, генетическом коде были теоретическими. Можно было выделить ДНК практически из любых организмов, но *невозможно было выделить отдельный ген*. Гены идентифицировали наблюдением за корреляцией специфических мутаций (наблюдение фенотипа).

Технология получения рекомбинантной ДНК позволила впервые в практике научных исследований выделить из организма индивидуальный ген. Это стало точкой отсчета для развития науки генной инженерии.

Почему изолировать ген так важно? Выделение гена дает возможность исследовать его структуру, выяснить закономерности организации и строения,

сравнить с другими генами и определить последовательность аминокислот белка, который этот ген кодирует. Знание белкового продукта позволяет сделать заключение о функции гена. И, наконец, знание структуры гена дает возможность его целенаправленной модификации.

Теоретические предпосылки для генной инженерии:

1. К началу развития науки генной инженерии был установлен механизм информационного взаимодействия между основными макромолекулами, участвующими в передаче наследственной информации от одного организма другому. Это – *репликация*, матричный синтез ДНК, при котором цепочка ДНК расплетается, и на каждой образуются новые, комплементарные. По такому же механизму на ДНК синтезируются комплементарные ей РНК – *транскрипция*. На матрице РНК на рибосомах осуществляется синтез белка, структура которого соответствует структуре мРНК – *трансляция*.

2. Следующий шаг на пути к генной инженерии – открытие внехромосомной самореплицирующейся ДНК или мини-хромосом, которые получили название *плазиды*.

3. Выделение и получение ферментов *рестриктаз*, которые специфически расщепляют ДНК, позволило манипулировать с фрагментами ДНК и привело к возможности изолировать индивидуальный ген.

Приемы генной инженерии позволяют проводить рекомбинацию ДНК *in vitro* и только затем вводить целевую конструкцию в клетку, где происходит *экспрессия гена*.

История молекулярного клонирования начинается в 1972 г, когда впервые *in vitro* была получена рекомбинантная молекула ДНК из фрагментов разных ДНК. Вирусная ДНК SV40 и ДНК фага лямбда были объединены в лаборатории П.Берга (Станфордский университет, США). В 1973 г. Коэн и Бойер использовали для получения рекомбинантной ДНК плазмидную ДНК и получили первую гибридную плазмиду, которую можно ввести в бактериальные клетки и получить экспрессию чужеродной ДНК *in vivo*. Стало очевидным, что новый метод открывает неограниченные возможности. Далее

следует 35-летняя история развития науки о молекулярном клонировании. В итоге, осуществлен прорыв в понимании структуры гена, получены качественно новые знания об организации наследственной информации. К ним можно отнести открытие мозаичного строения генов эукариот в отличие от генов прокариот, идентификацию мобильных элементов, разработку информационных технологий, создание мировых баз данных для анализа и сравнения генов. Более того, появилась возможность искусственно создавать гены, кодирующие химерные полипептиды, обладающие свойствами двух или более природных белков. Впечатляющие успехи генной инженерии в практических достижениях. Данний подход открыл перспективы создания принципиально новых микробных продуцентов биологически активных веществ, а также животных и растений, несущих функционально активные чужеродные гены.

Стратегия молекулярного клонирования

Универсального метода получения рекомбинантной ДНК не существует. Принцип метода соответствует схеме (Рис. 1):

- получают фрагменты ДНК из организма донора, которые могут содержать от одного до нескольких генов;
- каждый из фрагментов лигируют с векторной ДНК с образованием рекомбинантной молекулы, векторная ДНК несет маркер устойчивости к антибиотику;
- смесь рекомбинантных ДНК используют для трансформации в клетки-реципиенты, где плазмида реплицируется и передается потомству;
- рекомбинантные клетки отбирают на селективных средах;
- если рекомбинантные клетки производят белок, идентичный донорной ДНК, это является подтверждением молекулярного клонирования.

Таким образом, стратегия молекулярного клонирования заключается в том, чтобы изолировать индивидуальный ген или гены из большого и сложного генома и «переселить» его (их) в маленький и очень простой геном.

Для клонирования генов может служить геномная ДНК, кДНК, которая синтезируется с помощью обратной транскриптазы на матрице РНК, амплифицированная ДНК, полученная с помощью полимеразной цепной реакции, а также синтетическая ДНК, синтезированная *in vitro* из нуклеотидов.

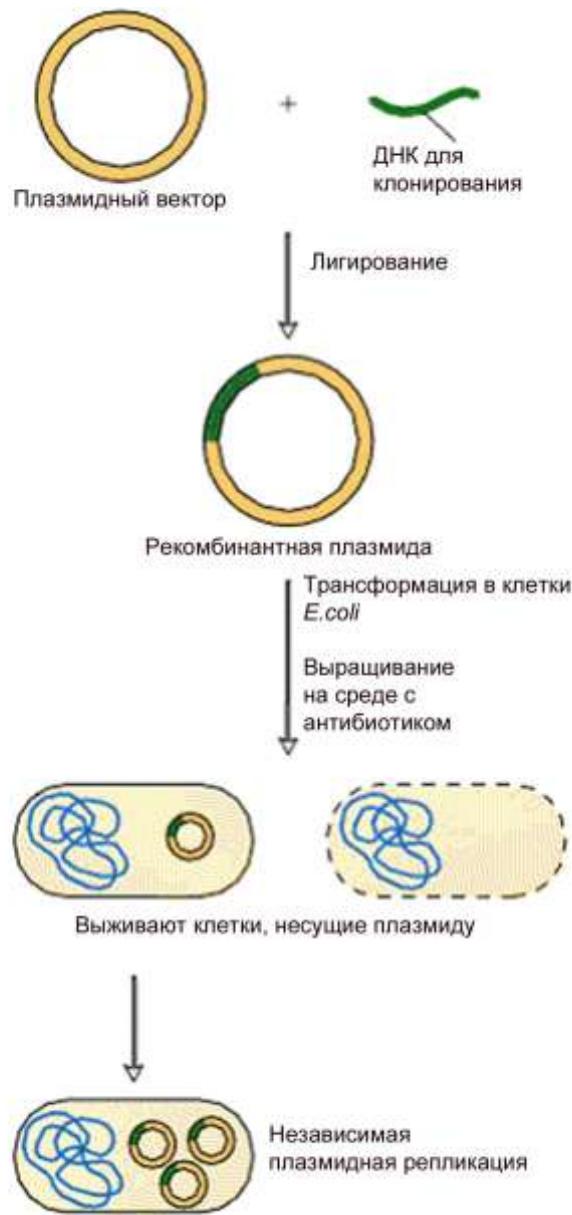


Рис. 1. Общая стратегия молекулярного клонирования

[<http://www.ncbi.nih.gov/book/ Modern Genetic Analysis/recombinant DNA technology>]

Если в качестве исходной ДНК используется геномная ДНК, то сначала проводят клонирование случайных участков ДНК (Shotgun-клонирование). Когда на одном из больших фрагментов обнаружен ген, проводят субклонирование, т.е. расщепляют фрагмент мелкощепящими рестриктазами.

Присоединение ДНК к клонирующему вектору проводят с помощью ДНК-лигазы. Векторы последнего поколения содержат мультиклонирующий сайт (полилинкер) – сегмент ДНК, содержащий различные сайты рестрикции (обычно они перекрываются друг с другом).

Процесс введения рекомбинантных векторов в клетки-хозяева называется трансфекцией. Трансфекция может осуществляться несколькими способами в зависимости от природы вектора: трансформацией, конъюгацией и трансдукцией гетерологичной ДНК.

Трансформация – способность бактериальной клетки поглощать молекулы ДНК из раствора. Выход трансформантов низкий и составляет 10^{-5} , зависит от штамма, размера ДНК и условий эксперимента. Существует несколько способов для увеличения эффективности трансформации. Клетки подвергают температурному воздействию и обрабатывают раствором CaCl_2 . В результате такой обработки происходит локальное разрушение клеточной стенки, что облегчает проникновение ДНК в клетку. Такая обработка дает максимальную частоту трансформации, примерно 10^{-3} . Такой же эффект достигается при использовании для трансформации протопластов и сферопластов, в результате чего мембрана становится более доступной. К увеличению частоты трансформации приводит также обработка клеток полиэтиленгликолем в результате частичного повреждения цитоплазматической мембраны. Для увеличения частоты трансформации используют физический метод – электропорацию, что приводит к увеличению мембранной проницаемости. Смесь клеток и ДНК подвергают электрическому разряду 2-4 тыс в, при этом в мембране образуются каналы и через них внутрь клетки проникает ДНК. Клоны, несущие рекомбинантные плазмиды, легко отобрать за счет идеального селективного маркера – антибиотикоустойчивости.

Конъюгация – перенос ДНК из клетки-донора в клетку-реципиент. Большинство плазмид, которые используются в работе с рекомбинантными ДНК, не конъюгативные и не способны самостоятельно переходить в клетки

путем конъюгации. Поэтому их вводят в клетки вместе с конъюгативными плазмидами, предназначенными для переноса по механизму мобилизации.

Трансдукция – инъекция ДНК бактериофага в бактериальную клетку. В процессе инфекции бактериофаги адсорбируются на поверхности клетки и проникают в нее с частотой близкой 100% в отличие от низкоэффективной трансформации. Таким образом, если *in vitro* упаковать рекомбинантную ДНК в головки фага, то можно ожидать ее эффективный перенос в клетку хозяина.

Хранение. Первичное клонирование ДНК обычно дает набор клонов, соответствующих полному геному. Такая смесь клонов, полученных в результате расщепления индивидуального генома, называется ДНК-библиотекой или библиотекой генов. ДНК может храниться в виде клонов на векторах, каждый из которых при необходимости может быть востребован.

Идентификация клона. Процедура направлена на поиск необходимого клона в смеси, иногда из тысяч клонированных фрагментов. Эта задача сложная, но существующая техника позволяет успешно провести идентификацию даже в случае очень больших геномов (иммунологический скрининг, пульс-электрофорез, ДНК-гибридизация, ДНК-микрочипы, скрининг по активности белка).

После клонирования ДНК ее секвенируют, проводят поиск открытой рамки считывания, затем конвертируют последовательность нуклеотидов в белковый продукт, при необходимости проводят сайт-специфический мутагенез и изучают продукты экспрессии. Если сиквенс показал, что клон содержит неполную рамку считывания, то процедуру клонирования повторяют, применяя другую рестриктазу для расщепления исходной ДНК.

Типы молекулярных векторов

В зависимости от поставленной задачи исследователи используют разные типы молекулярных векторов.

Векторы-амплификаторы способны амплифицировать (размножаться) до 1-3 тыс. копий на клетку. Число копий плазмид, находящихся под ослабленным

контролем, составляет 100-200 копий на клетку. Это число может увеличиться до нескольких тысяч копий на клетку, если подавить синтез белков хозяина, обработав клетки бактерий хлорамфениколом. Хлорамфеникол связывается с большой рибосомной субъединицей и ингибитирует образование пептидной связи, т.е. ингибитирует пептидил-трансферазу. В этих условиях репликация плазмид под ослабленным контролем продолжается, а репликация хромосомной ДНК и плазмид, находящихся под строгим контролем, прекращается. Плазмиды, способные амплифицировать при глобальной блокаде синтеза белка, не обнаружены у бацилл.

Векторы экспрессии – это векторы, которые содержат регуляторные элементы для эффективной транскрипции и трансляции клонированных генов.

Для эффективной транскрипции нужны сильные промоторы. Все природные промоторы *E. coli* имеют консенсусы в -10 (бокс Прибнова) и -35 областях от сайта инициации транскрипции. По частоте встречаемости нуклеотидов в каждой из позиций были построены оптимальные -10 и -35 последовательности: -10 (ТАТААТ) и -35 (ТТГАСА). Многие гены *E. coli* контролируются относительно слабыми промоторами, характеризующимися низкой гомологией к консенсусным. Чем больше различия между ними, тем слабее промотор. Вектор экспрессии должен иметь сильный промотор, к нему относятся следующие:

lac-промотор (Plac) - промотор lac-оперона;

trp- промотор (Ptrp) - промотор триптофатового оперона;

tac-промотор (Ptac) - синтетический промотор с -10 областью от Plac, и -35 от Ptrp.

Сильные промоторы обнаружены у фагов: промотор фага лямбда (Р λ) и промотор фага Т7. Из них последний узнает только фаговая Т7РНК-полимераза. Поэтому вектор экспрессии, содержащий промотор фага Т7, должен содержать ген Т7РНК-полимеразы под регулируемым lac-промотором. В этом случае экспрессия белка под промотором Т7 начинается только после транскрипции гена Т7РНК-полимеразы.

Для эффективной трансляции вектор экспрессии должен иметь последовательность Шайна-Дальгарно (SD) – это сайт связывания с рибосомой. Он состоит из 5-8 нуклеотидов, преимущественно пуринов (А и Г), располагается вблизи (~ 10 п.о.) старт-кодона AUG, с которого начинается открытая рамка считывания (ORF). Последовательность SD должна быть комплементарна сегменту на 3'-конце 16S рРНК, чтобы мРНК могла эффективно связаться с 30S субъединицей рибосомы.

Сайт SD отсутствует в структуре генов эукариот. Поэтому чтобы эукариотический ген успешно экспрессировался в бактериях вектор экспрессии должен содержать последовательность SD вблизи 5'-конца клонированной ДНК. Такими свойствами обладают векторы серии pUC.

Фьюжин-векторы (fusion) – это векторы-химеры на основе плазмид или фагов, содержащие регуляторную часть одного гена, а структурную часть другого гена. Клонируемый ген вводят в эти векторы так, чтобы регуляторная область бактериального гена оставалась неизменной, а встраивание происходило в его структурную часть. При совпадении рамки трансляции бактериального гена с рамкой трансляции встроенного гена синтезируется химерный белок, который обладает свойствами целевого экзогенного белка. Однако не всегда рамки трансляции бактериального и встраиваемого генов совпадают. В таких случаях клонируемая последовательность будет транслироваться неправильно. Чтобы преодолеть это затруднение, создают наборы векторов, в состав которых входит одна и та же регуляторная область, но в участке встройки чужеродных последовательностей в каждом векторе имеется сдвиг рамки трансляции относительно другого вектора. Обычно такой сдвиг достигается встройкой коротких синтетических фрагментов. Используя набор из трех векторов, можно клонируемую последовательность поместить во все три возможные фазы трансляции, относительно бактериального полипептида, с которым объединяется изучаемая ДНК. Одна из конструкций обязательно будет обеспечивать правильный синтез целевого белка.

Челночные (бинарные) векторы – это гибридные плазмиды, которые способны реплицироваться как в клетках *B. subtilis*, так и в клетках *E. coli*. Чужеродные гены первоначально клонируют в методически более простой системе *E. coli*, для которой детально разработаны приемы генной инженерии. В этой же системе проводят целенаправленные модификации генно-инженерных конструкций, а затем отобранные и модифицированные дверепликонные гибридные плазмиды переносят в клетки *B. subtilis*. Используя дверепликонные векторы, можно изучать функционирование одной и той же генетической конструкции в клетках различных типов. Более того, векторы, содержащие участки инициации репликации различных организмов, например, *E. coli* дрожжей, и другие пары, способны реплицироваться в клетках бактерий и эукариот. Первые членочные плазмиды были получены в 1978 г. в лаборатории С. Эрлиха. Они состояли из двух плазмид, гидролизованных рестриктазой HindIII: pC194 (Cm^r) и pBR313, pBR322 (Ap^rTc^r). Гибридные плазмиды реплицировались в клетках *E. coli* и *B. subtilis*. При этом в *E. coli* наблюдали экспрессию всех генов устойчивости к антибиотикам, а в *B. subtilis* – только гена *cat* (Cm^r) плазмида pC194.

Векторы секреции. Одно из актуальных направлений генной инженерии бактерий – создание штаммов, секретирующих чужеродные белки. Перспективы их создания связаны с бациллами, поскольку эти бактерии эффективно секретируют различные белки в среду. Хорошо изучена секреция альфа-амилазы, пенициллиназы, протеазы, фосфатазы и рибонуклеазы. Эффективность секреции обусловлена присутствием в структуре этих белков сигнальных пептидов. Обычно у белков бацилл они длиннее (29-34 аминокислоты) по сравнению с белками грамотрицательных бактерий и животных (15-25 аминокислот). Клонируя гены секретируемых белков, и удаляя затем кодирующую последовательность зрелой формы, можно создать молекулярные векторы секреции для грамположительных бактерий рода *Bacillus*. Первый вектор секреции был создан в лаборатории И.Палва в 1982 г. на основе гена альфа-амилазы (*amyE*). Клонированный ген *amyE*

модифицировали так, чтобы после сигнального пептида следовал участок узнавания рестриктазой. Был сконструирован вектор pKTH114, содержащий 5'-концевой сегмент гена *amyE* с лигированными HindIII-линкером и стоп-триплетами в трех рамках трансляции. Такой вектор был предназначен для клонирования кодирующих гетерологичных последовательностей. Применяя его, удалось осуществить синтез и секрецию из клеток *B. subtilis* различных эукариотических белков, включая интерфероны человека и мыши. В этой системе максимальный выход гетерологичных белков наблюдался в экспоненциальной фазе роста. Это обусловлено тем, что в фазе замедления роста у бацилл активируется синтез различных внеклеточных протеаз, расщепляющих чужеродный белок. Поэтому при создании штаммов-продуцентов бацилл большое внимание уделяют получению протеазо-дефицитных мутантов для использования их в качестве штаммов-реципиентов гибридных плазмид. Активность протеаз можно значительно снизить путем подбора питательной среды на основании данных о биосинтезе этих ферментов.

Целенаправленное использование регуляторных элементов в структуре генов бацилл позволяет получить высокоуровневую продукцию. Так биосинтез нейтральной (*npr*) и щелочной (*apr*) протеаз у *B. amyloliquefaciens* в оптимальных условиях роста может достигать 3-5 г/л. Такой высокий уровень синтеза представлял интерес для создания на основе этого гена высокоэффективного вектора секреции. Был получен вектор pES150 (1986 г.), содержащий промоторную область, сигналы инициации трансляции (SD) и препропептидную область гена *npr*. В правильной рамке трансляции к фрагменту гена *npr* лигировали кодирующие последовательности генов гормона роста и фибробластного интерферона человека и получили эффективную секрецию чужеродных белков рекомбинантными клетками бацилл. При этом интерферон человека продуцировался на уровне 10^9 ед/л.

Исследования по созданию векторов на основе секретируемых белков бацилл показали, что не всегда конструирование эффективно. Процесс экспорта зависит не только от присутствия сигнального пептида в структуре вектора, но

также от других факторов, обеспечивающих транслокацию, транспорт через клеточную стенку и фолдинг секретируемого белка. Более того, встраиваемая ДНК должна содержать промотор, участок связывания рибосом, сигнальный пептид и чужеродный ген в правильной ориентации, при этом рамка трансляции последнего должна совпадать с сигнальным пептидом. Поэтому для достижения результата обычно создают набор гибридных клонов с использованием гидролизатов ДНК, полученных различными рестриктазами.

Принципиально-новым этапом в развитии этих исследований является получение генно-инженерных штаммов на основе иммобилизованных клеток бацилл. Иммобилизованные клетки *B. subtilis*, несущие вектор секреции, содержащий промоторную область гена пенициллиназы *B. licheniformis* и кодирующую область гена проинсулина крысы, секретировали в среду целевой белок в течение нескольких суток.

Интегративные векторы. Культивирование генно-инженерных штаммов бактерий в производстве протекает в течении длительного времени и может сопровождаться потерей плазмид. В других случаях нестабильность рекомбинантных плазмид может быть вызвана токсическим эффектом целевого продукта. При этом штаммы, утратившие плазмиду, получают селективное преимущество. Для преодоления этих трудностей проводят интеграцию чужеродной ДНК в хромосомную ДНК клетки-реципиента. Встраивание чужеродной ДНК в геном проводят с помощью интегративных векторов. Интегративный вектор содержит сегмент ДНК, гомологичный фрагменту бактериальной хромосомы. С помощью рекомбинации вектор способен с высокой эффективностью встраиваться в хромосомную ДНК. Такие векторы содержат гены резистентности к антибиотикам. Используя интегративные векторы можно встраивать в геном чужеродную ДНК. В процессе интеграции плазмид может происходить их tandemная дупликация. Для *E. coli* показано, что плазмида pBR322, содержащая участок хромосомной ДНК *E. coli*, интегрирует в геном бактерий в множестве копий при культивировании этих бактерий на среде с повышенной концентрацией антибиотика. После

интеграции в геном *B. subtilis* плазмиды pC194 с геном *cat* (Cm^r), можно добиться ее многократной дупликации на средах с повышающейся концентрацией хлорамфеникола. Явление амплификации, по-видимому, связано с процессом ответа организма на условия среды. Таким образом, в условиях, позволяющих поддерживать амплифицированное состояние интегративного вектора, можно добиться высокого выхода целевого продукта.

И.Палва с сотрудниками (1987 г.) сравнивали продукцию внеклеточной альфа-амилазы, ген которой экспрессировался с плазмида, или с двух копий гена в составе хромосомы. Оба штамма показали приблизительно одинаковый результат, в то же время штамм с интегрированными копиями гена *amyE* отличался более продолжительным временем синтеза фермента. Последняя характеристика свидетельствует в пользу промышленного применения штамма с интегрированным чужеродным геном.

Итак, конструирование генно-инженерных штаммов требует индивидуального подхода и анализа всех факторов, от которых зависит выход целевого продукта. После создания векторной системы необходимо подобрать условия для эффективной репликации и структурной стабильности рекомбинантных плазмид. Особенно это важно для крупномасштабного культивирования. Нестабильность структуры может быть обусловлена влиянием сильного промотора, содержащегося в проклонированном фрагменте, рекомбинационными событиями, приводящими к делециям. При трансформации членочных плазмид они могут подвергаться атаке систем рестрикции, что также приводит к появлению делеционных производных. Делеционные плазмиды, как правило, при последующем пассировании стабильно сохраняют свою структуру.

Векторные молекулы ДНК

Для создания векторов для переноса чужеродной ДНК используют плазмиды, бактериофаги и вирусы. Вектор должен обладать следующими характеристиками: обеспечивать репликацию чужеродного фрагмента ДНК,

иметь уникальные сайты рестрикции и содержать генетический маркер для отбора рекомбинантных клонов.

Плазмиды – это внехромосомные автономно реплицирующиеся молекулы ДНК, не способные к самостоятельному существованию вне клетки. У одних плазмид репликация строго зависит от соответствующих ферментных систем бактерий, это плазмиды с узким спектром хозяев, часто они присутствуют только в клетках одного вида бактерий. Другие плазмиды кодируют белки, которые обеспечивают относительную автономность их репликации. Такие плазмиды способны реплицироваться в бактериях, относящихся к разным видам. Плазмиды несут гены, которые обуславливают фенотипическое отличие содержащих их клеток от бесплазмидных (селективный маркер), (Рис. 2).



Рис. 2. Структура плазмидного вектора: *ori* – сайт инициации репликации, *amp^r* – ген устойчивости к антибиотику, обеспечивающий селективный отбор, регион для клонирования должен содержать уникальные сайты рестрикции.

Плазмиды, не выявляемые фенотипически, называют криптическими. Различают плазмиды высокой и низкой копийности. Репликация первых находится под ослабленным контролем, в результате чего число их копий в клетках может составлять от 10 до 200. Репликация плазмид низкой копийности находится под строгим контролем и число их копий в клетке составляет от 1 до 10.

В основе классификации плазмид – их деление по группам несовместимости (Inc-группы). К одной Inc-группе относят плазмиды, которые несовместимы между собой, но совместимы с любой плазмидой из других групп. Плазмиды,

относящиеся к одной Inc-группе, обладают, как правило, многими сходными признаками и часто обнаруживают значительную гомологию ДНК.

В основе методов выделения ДНК плазмид два принципиальных различия плазмидной и хромосомной ДНК: хромосомная ДНК существенно больше плазмидной ДНК и является линейной молекулой в отличие от ковалентно замкнутой молекулы плазмидной ДНК. Выделение хромосомной ДНК должно включать осаждение, при котором удаляются преимущественно длинные фрагменты хромосомной ДНК. В щелочной среде (рН 10) происходит денатурация обоих молекул ДНК. При нейтрализации среды (рН 7) небольшие кольцевые ДНК плазмид эффективно ренатурируют в отличие от линейных фрагментов хромосомной ДНК, которые из-за крупных размеров не способны к точной ренатурации.

Итак, плазмиды обладают основными свойствами, позволяющими использовать их в качестве вектора для переноса чужеродной ДНК: небольшой размер, наличие уникальных сайтов рестрикции для молекулярного клонирования и селективного маркера для идентификации реципиентных клеток. С помощью плазмидных векторов можно клонировать фрагменты ДНК размером до 10 кб. С увеличением размера вставки вектор элиминирует при пассировании. Для работы с более крупными фрагментами ДНК в 1974 г. были разработаны векторы на основе фага лямбда *E. coli*.

Векторы на основе фага λ. ДНК фага лямбда - это линейная двухцепочечная молекула размером около 48502 п.о. с одноцепочечными 5'-концами из 12 нуклеотидов. Их называют *cos*-концами (*cos*-сайтами), они взаимокомplementарны и могут спариваться друг с другом с образованием кольцевой молекулы. В зрелых вирионах ДНК находится в форме линейной молекулы, попадая в клетку, ДНК циклизуется по *cos*-сайтам и функционирует в кольцевой форме.

Стратегия клонирования. Третья часть ДНК фага лямбда, около 20 кб, расположенных в середине, несущественна для размножения фага и

ответственна за встраивание в хромосомную ДНК (Рис. 3).

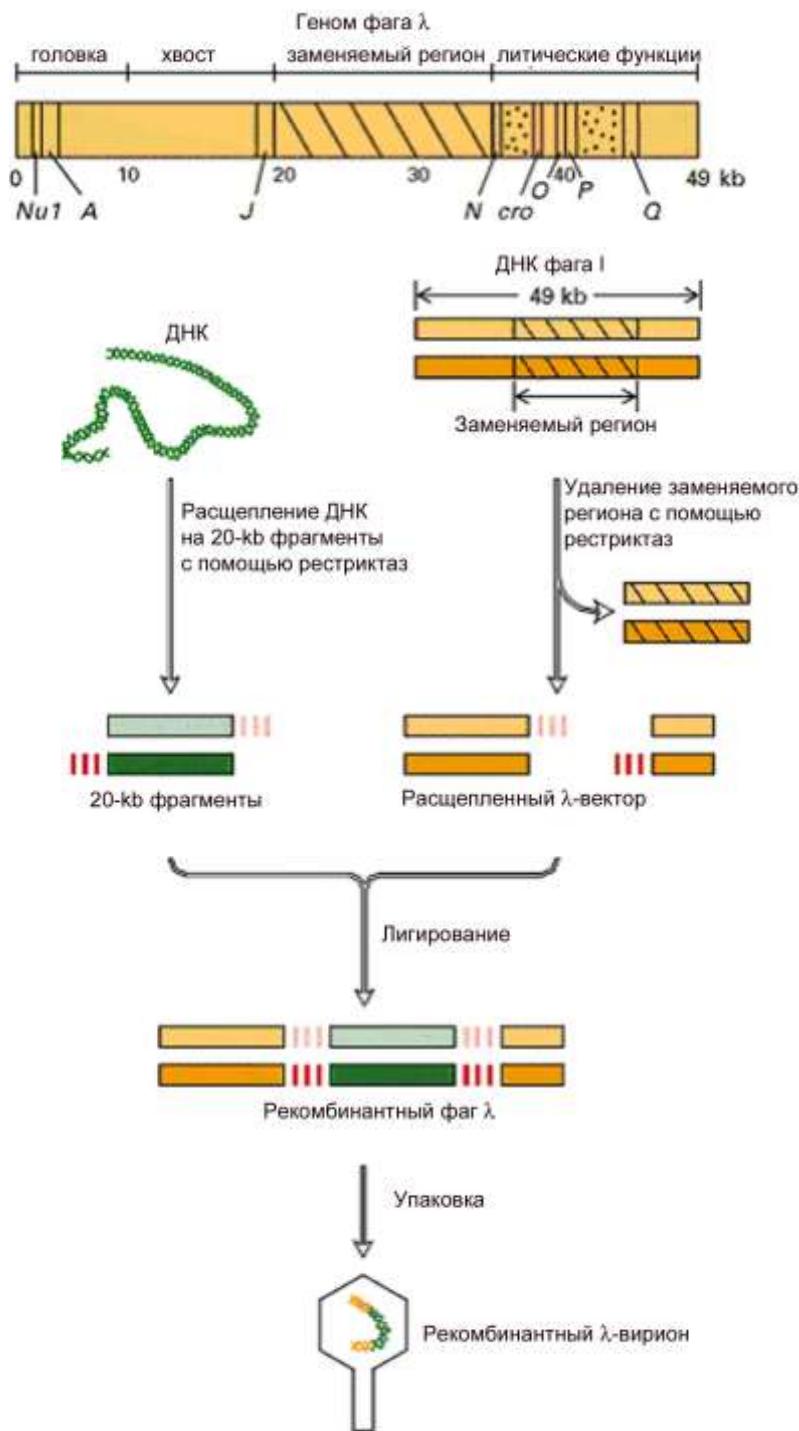


Рис. 3. Структура генома фага и конструирование векторов на основе бактериофага лямбда

[<http://www.ncbi.nih.gov/book/Molecular Cell Biology /recombinant DNA and Genomics>]

Этот сегмент можно заменить чужеродной ДНК. Рекомбинантная ДНК будет реплицироваться как фаговая ДНК по литическому пути развития. Фаговая ДНК упаковывается в головки в цитоплазме клеток *E. coli*. **Упаковочная реакция лежит в основе клонирования:** смешав в пробирке пустые

головки, рекомбинантную ДНК и отростки можно получить зрелые фаговые частицы.

ДНК фага лямбда имеет два BamHI-сайта, фланкирующих участок размером около 20 кб. При гидролизе фаговой ДНК рестриктазой BamHI образуются три фрагмента – L-левое плечо, которое содержит информацию о головке и отростке фага лямбда, R-правое плечо, которое содержит информацию о репликации фаговой ДНК и лизисе бактериальной клетки (Рис. 3). Средний сегмент ДНК кодирует белки, ответственные за интеграцию в хромосомную ДНК. Этот участок фаговой ДНК замещается чужеродной ДНК. ДНК, предназначенная для клонирования, предварительно расщепляется рестриктазой BamHI, рестрикты фракционируют и отбирают фрагменты размером до 20 кб (Рис. 3). Оба препарата, фаговую и чужеродную ДНК смешивают в одной пробирке и обрабатывают ДНК-лигазой. Лигированная смесь будет содержать разные комбинации ДНК, в том числе и восстановленную ДНК фага лямбда. Далее рекомбинантные молекулы смешивают с головками и отростками фага лямбда, и *in vitro* происходит самосборка зрелых фаговых вирионов. *Правило таково, что в фаговые головки упаковываются только фрагменты около 50 кб, ДНК по размеру более 52 кб не умещается в головку, ДНК по размеру менее 38 кб после упаковки дает не инфицирующие фаговые частицы.* На следующем этапе необходимо отделить рекомбинантные фаги. Для этого ими инфицируют клетки *E. coli*, в хромосому которых интегрирован фаг P2. Клетки *E. coli*-P2 приобретают иммунитет на другие бактериофаги, способные встраиваться в хромосому. Поэтому инфицировать такие клетки способны только рекомбинантные бактериофаги с делетированной областью интеграции. Полноценные фаги лямбда не включаются в клетки *E. coli*-P2.

Преимущество использования фага лямбда перед плазмидами в том, что можно клонировать до 20 кб чужеродной ДНК. Эффективность внедрения рекомбинантных фагов составляет 100% в отличие от трансформации, при которой эффективность внедрения ДНК составляет 10^{-4} - 10^{-5} . Некоторые

продукты чужеродных генов токсичны, их трудно клонировать на плазмиде. В этом случае идеально подходит вектор на основе фага лямбда не интегрирующего типа. Хозяйские клетки быстро лизируют и токсичность для их жизнедеятельности не актуальна. И в заключении, векторы на основе фага лямбда являются эффективными векторами экспрессии для получения белковых продуктов. Они имеют сильные промоторы (P_L и P_R) и антiterминальный белок N, подавляющий терминацию транскрипции.

Космиды – это плазмиды с *cos*-сайтами фага лямбда. Космиды могут амплифицироваться как плазмидный вектор в клетках *E. coli* и быть нагруженными до 40 кб чужеродной ДНК. С другой стороны, с помощью *cos*-сайтов космиды могут быть упакованы в лямбда вирион. Космиды содержат *cos*-сайты фага лямбда, полилинкер с шестью уникальными сайтами рестрикции, *oriE* – точку начала репликации *E. coli* и в качестве детерминирующего признака – ген устойчивости к антибиотику (*amp^r*) (Рис. 4). ДНК, предназначенную для клонирования, гидролизуют рестриктазой BamHI и фракционируют фрагменты по 40 кб. Космидный вектор сначала обрабатывают рестриктазой с образованием линейной молекулы ДНК. Препараты чужеродной и векторной ДНК смешивают и лигируют. Продукты лигирования, которые содержат 40 кб вставку чужеродной ДНК, имеют суммарную ДНК размером 50 кб и, таким образом, способны упаковываться *in vitro* в головки фага лямбда. Фаговый фермент узнает *cos*-последовательности ДНК и катализирует упаковочную реакцию.

После сборки фаговых частиц ими инфицируют клетки *E. coli*. В бактериальной клетке линейная молекула вектора, содержащая чужеродную ДНК, циклизуется благодаря *cos*-сайтам. Она может долго существовать в такой стабильной конфигурации и реплицироваться как гибридная плазмода. Ген устойчивости к антибиотику обеспечивает рост бактерий на селективной среде. Нетрансформированные клетки при этом погибают.

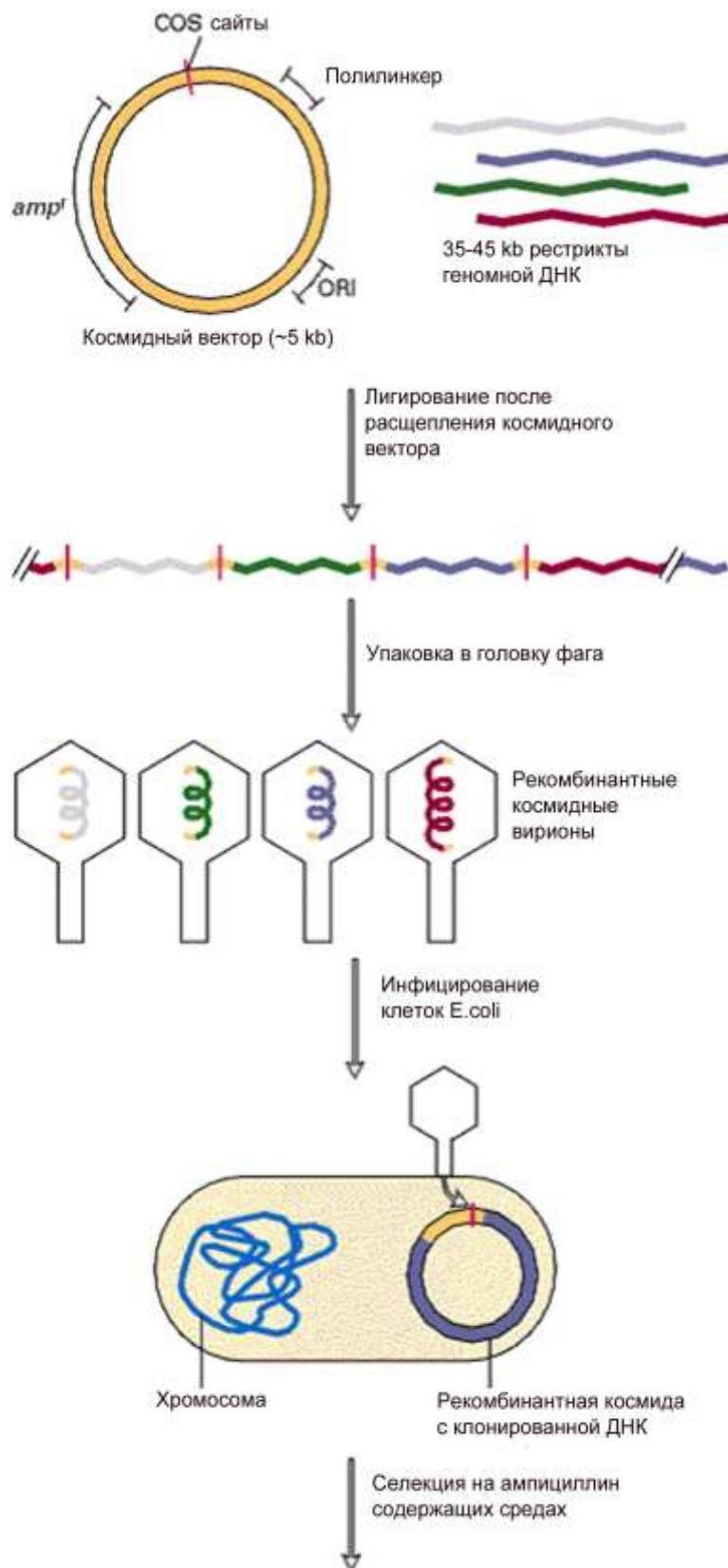


Рис. 4. Клонирование на космидном векторе [http://www.ncbi.nih.gov/book/ Molecular Cell Biology /recombinant DNA and Genomics]

Преимущества космидных векторов. В космидный вектор можно встраивать более протяженные фрагменты ДНК (40 кб) по сравнению с плазмидным или фаговым вектором, поскольку собственная ДНК космидного вектора мала, около 10 кб и способна эффективно доставлять рекомбинантную ДНК с помощью фага лямбда. По этой причине космиды используют при клонировании геномной ДНК эукариот.

Фазмиды – это искусственные гибридные векторы, включающие ДНК фага и плазмиды. Фазмиды после встройки чужеродной ДНК могут в одних условиях развиваться как фаги, а в других как плазмиды. Исходно фазмиды имеет размер до 30 кб. В ее состав входит до 70% генома фага, включая *cos*-сайты и *ori*-последовательность фага. В то же время фазмидный вектор содержит *ori*-последовательность плазмиды. Хотя фазмиды содержит все гены, необходимые для лизического развития фага лямбда, она не способна к образованию негативных колоний, поскольку столь малая ДНК не упаковывается в капсиды. Фазмиды поддерживается в клетках *E. coli* в виде плазмидного вектора. При встраивании чужеродной ДНК *in vitro* происходит увеличение размера вектора, что придает фазмиде свойства недефектного фага. Таким образом, размер вставки составляет до 20 кб, что соотносится с размером вставки для векторов на основе ДНК фага лямбда. Фазмидную ДНК выделяют из клеток бактерий как плазмидную ДНК, гидролизуют рестриктазой, лигируют с продуктами гидролиза чужеродной ДНК, предназначеннной для клонирования, а затем проводят упаковку рекомбинантной ДНК в капсиды фага лямбда.

Преимущества фазмид. Применение фазмидных векторов значительно упрощает процедуру получения и отбора рекомбинантных векторов, поскольку только рекомбинантные фазмиды образуют на бактериальном газоне фаговые бляшки. В отличие от космидной или фаговой векторных систем, фазмидный вектор существует в клетке в виде плазмиды, а клонотека хранится в виде суспензии гибридных фагов.

Векторы на основе однонитевых фагов. В плазмидах или производных фага лямбда чужеродная ДНК находится в двухцепочечной форме. Тем не менее,

имеются экспериментальные задачи, которые базируются на манипуляциях с одноцепочечной ДНК. Например, определение последовательности нуклеотидов (секвенирование), выделение комплементарной РНК или олигонуклеотид-направленный мутагенез. В этих случаях приходится денатурировать молекулы ДНК, но это не всегда просто. Поэтому возникла потребность клонировать ДНК в одноцепочечных векторах. Для этой цели используют нитевидные фаги *E. coli*: M13, fd и f1. Длинные (около 900 нм), тонкие (7 нм) и гибкие вирионы этих фагов представляют собой кольцевую одноцепочечную ДНК (оцДНК) длиной 6407 нуклеотидов (M13) и 6408 нуклеотидов (fd и f1). Фаговая ДНК упакована в трубочку из 2700 копий основного оболочечного белка pVIII и закрытую на концах четырьмя или пятью молекулами каждого из четырех минорных оболочечных белков. Нитевидные фаги адсорбируются на F-пилях *E. coli* и поэтому способны инфицировать только F⁺-клетки бактерий.

Особенности генома ДНК фага M13. ДНК фага M13 не имеет участков узнавания для рестриктаз, образующих липкие концы. Фаговый геном не содержит генетических маркеров, которые позволили бы выявить гибридные фаги. Поэтому создание векторов клонирования на основе M13 включает введение в геном фага селективных маркеров и уникальных сайтов рестрикции, т.е. полилинкеров. В геноме нитевидных фагов нет области, несущественной для жизнедеятельности фагов. Для конструирования используют межгененную область протяженностью 500 нуклеотидов (**IR-область**). Все модификации этого участка ДНК (делеции, вставки) проходят без нарушения жизнеспособности фага. Рекомбинантные фаговые векторы получают путем клонирования чужеродной ДНК в этом участке фагового генома. По величине вставка не имеет ограничений, хотя вставки очень большого размера имеют тенденцию к спонтанному элиминированию. Однонитевые фаги заражают клетки *E. coli* и непрерывно в них размножаются. Образующиеся фаговые частицы постоянно экскретируются клетками без лизиса последних, процесс является энергозависимым. В течении одной генерации образуется несколько

сотен фагов на клетку (200-300 копий на клетку). Векторная система на основе нитевидных фагов интенсивно развивается, и получила название *фаговый дисплей*.

Фагмиды. Расширить возможности использования одноцепочечных векторов удалось путем совмещения плазмид и нитевидных фагов в одну молекулу ДНК. Такие векторы были названы фагмидами. Для получения фагмидного вектора плазмидную ДНК лигируют с репликативной формой ДНК фага, которая содержит все действующие элементы фагового генома, необходимые для его репликации, а также IR-область, необходимую для молекулярного клонирования. Созданный гибридный вектор обладает свойствами плазмид и фагов. Внутри клеток-хозяев фагмиды размножаются как плазмиды потому, что у них, как правило, отсутствуют гены, необходимые для сборки фаговой частицы. Они размножаются как фаги, если хозяин инфицирован вспомогательными фагами, которые поставляют белки для упаковки. Какая из цепи фагмиды (кодирующая (+) или матричная (-)) будет упакована в фаговый капсид зависит от ориентации ДНК фага в плазмиде. Векторные системы на основе нитевидных фагов успешно применяются для разработки новой технологии фагового дисплея белков, пептидов и антител. Ее суть заключается в том, что в составе фаговых капсидов экспрессируются целевые последовательности полипептидов, которые после сборки экспозируются на их поверхности. Вирионы с гибридными молекулами на поверхности легко тестировать, интересующий исследователя вариант выделить и размножить для дальнейшего изучения. Данное направление исследований имеет большое будущее.

Искусственные бактериальные хромосомы. В 1992 г. японские исследователи Х. Шизуя с соавторами описали новую бактериальную векторную систему, позволяющую клонировать фрагменты чужеродной ДНК размером до 300 кб. Эта система названа бактериальная искусственная хромосома - BAC (bacterial artificial chromosome). Основа вектора – F-плазмида (Рис. 5).

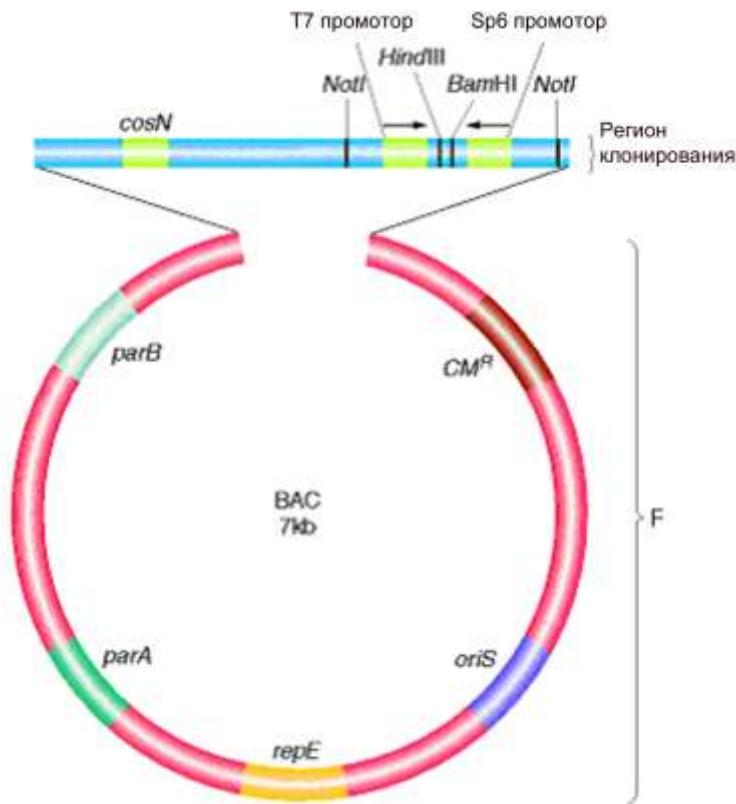


Рис. 5. Структура искусственной бактериальной хромосомы BAC

[<http://www.ncbi.nih.gov/book/Modern Genetic Analysis/recombinant DNA technology>]

Репликация и копийность F-плазмида находятся под строгим контролем, копийность составляет 1-2 молекулы на клетку. Это является важной характеристикой, поскольку высококопийные векторы находятся под ослабленным контролем и им свойственна структурная нестабильность, могут происходить нежелательные делеции или перестройки клонированных фрагментов ДНК. Вектор BAC создан на основе F-плазмида и содержит ее регуляторные генетические локусы: *oriS* – инициация репликации, продукт *repE* гена обуславливает одностороннюю репликацию фактора F с *oriS* – сайта, а продукты генов *parA* и *parB* обеспечивают правильное распределение фактора F между делящимися клетками и поддерживают копийность на уровне 1-2 молекул. В F-плазмиду по сайту *Sall* был встроен фрагмент ДНК, который содержал *cos*-сайты фага лямбда. Кроме того, встроенный фрагмент содержал уникальные сайты рестрикции *BamHI* и *HindIII*, предназначенные для клонирования, к ним подстыкованы сильные промоторы фагов T7 и Sp6 для

эффективного синтеза целевой ДНК, а также сайты NotI для крупноцепящей рестрикты для выщепления клонированных фрагментов.

Такой вектор японские исследователи лигировали с HindIII-рестриктами хромосомной ДНК человека. Полученные рекомбинантные плазмиды они вводили электропорацией в клетки *E. coli* и отбирали рекомбинантные клоны по устойчивости к антибиотику (Cm^r). После гидролиза клонов рестрикта NotI был определен размер вставки, он составил 125-300 кб. Пассирование клонов продемонстрировало их высокую стабильность. Аналогами ВАС-векторов являются РАС-векторы, которые созданы на основе фага P1. ВАС и РАС векторы используются при анализе сложных геномов и сыграли определяющую роль в картировании и секвенировании генома человека. Они используются для создания библиотек эукариотических геномов. В такой геномной библиотеке полностью представлен весь генетический материал организма.

Характеристики хозяев для векторов с чужеродной ДНК

Использование бактерий как хозяев для рекомбинантной ДНК требует выполнения ряда условий. Организм клеток хозяина должен иметь генотип, соответствующий эффективной репликации вектора. Оптимальными характеристиками хозяина являются: быстрый рост на недорогих средах, отсутствие патогенности, способность принять чужеродную ДНК и поддержание ее стабильности при культивировании. Бесспорным лидером при выборе штамма-хозяина являются бактерии *E. coli*. Выбор определяют фундаментальные знания генетики и биохимии этих микроорганизмов, секвенирована полная последовательность генома этих бактерий, для них разработаны и успешно применяются генно-инженерные методы. Недостатком является потенциальная опасность, связанная с условной патогенностью *E. coli*, средой обитания которых является кишечный тракт человека. Даже непатогенные штаммы *E. coli* производят эндотоксины, которые контаминируют выделяемые ими продукты, включая лечебные препараты (инсулин, гормон роста человека). Кроме того, секретируемые белки

выделяются в периплазму и это обстоятельство затрудняет очистку, т.к. разрушение клеток ведет к дополнительной контаминации конечных продуктов. Основные достоинства *B. subtilis* в том, что они не патогенны и секрецируют белки в среду. Тем не менее технология клонирования для них не развита так совершенно, как для *E. coli*. Другим ограничение является нестабильность бациллярных плазмид.

Итак, в зависимости от характеристики клеток-хозяев и величины клонированных фрагментов ДНК выбирают вектор-носитель (табл. 1):

Таблица 1. Векторы, используемые для молекулярного клонирования

Вектор	Оптимальная величина вставки, кб
Плазмида	10
Вектор на основе фага λ	20
Космида	40
Фазмида	20
Фагмида	До 100
Векторы на основе однонитевых фагов	До 100
ВАС и РАС	124-300

Клонирование структурных генов эукариот

Из-за разницы в строении генов прокариот и эукариот клонирование генов эукариот осуществляется путем создания библиотеки кДНК. Процедура клонирования начинается с выделения фракции мРНК. мРНК можно отделить от рибосомной и транспортной РНК за счет присутствия в ее структуре поли(А)-сегмента на 3'-конце. Для этого суммарную клеточную РНК пропускают через колонку с целлюлозой, иммобилизованной с поли(Т)-последовательностями. За счет комплементарного взаимодействия поли(Т) мРНК задерживается в колонке, а тРНК и рРНК проходят через нее. мРНК

элюируют денатурирующим буфером. Полученную фракцию мРНК используют в качестве матрицы для синтеза кДНК (Рис. 6).

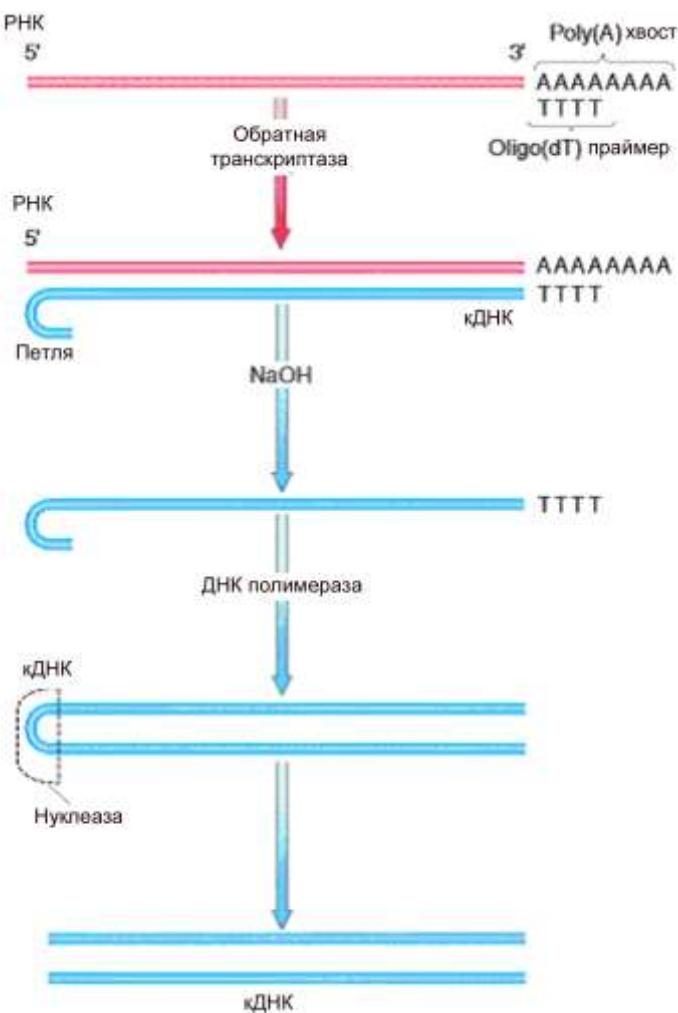


Рис. 6. Синтез кДНК на основе мРНК [http://www.ncbi.nih.gov/book/ Modern Genetic Analysis/recombinant DNA technology]

Применяют две полимеразы: обратную транскриптазу и фрагмент Кленова. Обратная транскриптаза синтезирует ДНК с 3'-конца и обычно поворачивает вспять и присоединяет несколько нуклеотидов в обратном направлении с образованием шпильки. В реакционную смесь добавляют фрагмент Кленова, который достраивает вторую цепь ДНК, используя первую как матрицу. После окончания синтеза препарат обрабатывают РНКазой Р, которая разрушает молекулы мРНК, и нуклеазой S1, которая расщепляет петлю. В результате получают линейные молекулы ДНК с тупыми концами без шпилек. кДНК встраивают в плазмидный вектор и получают библиотеку из кДНК.

Блоттинги

Когда доступны мРНК и кДНК, их можно использовать в качестве гибридизационного зонда для качественной и количественной оценки присутствия индивидуальных генов в тотальной ДНК или РНК клетки без процедуры клонирования. Для этого служит метод blotting по Саузерну, по имени ученого, который его изобрел (1975 г.). Суть метода – перенос нуклеиновых кислот из агарозных гелей на нитроцеллюлозную бумагу (Рис. 7).

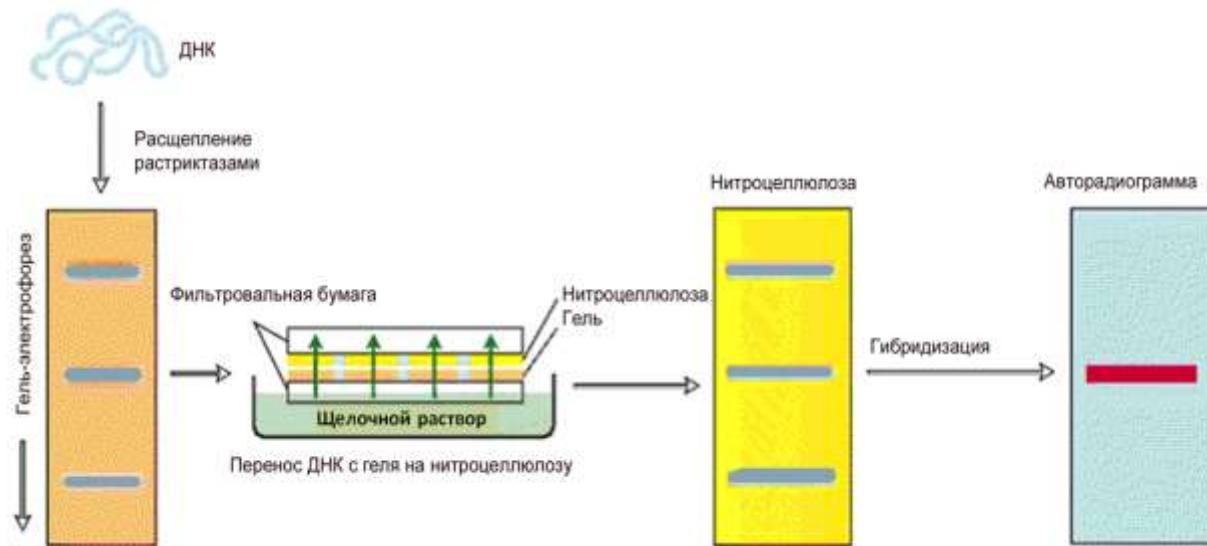


Рис. 7. Техника Саузерн-блота для определения присутствия специфического фрагмента ДНК в смеси рестриктов [http://www.ncbi.nih.gov/book/ Molecular Cell Biology /recombinant DNA and Genomics]

Сначала клеточную ДНК расщепляют рестриктазой (или рестриктазами) и фрагменты разделяют с помощью электрофореза в агарозном геле. Молекулы ДНК, разделенные по размеру, денатурируют щелочью, после нейтрализации щелочи, пластиину геля покрывают листом нитроцеллюлозы, на нее помещают фильтровальную бумагу, которая должна обеспечить медленный ток буферного раствора через гель. В этих условиях ДНК диффундирует из геля и связывается с нитроцеллюлозным фильтром. После прогревания фильтра при 80°C ДНК необратимо иммобилизуется на нитроцеллюлозе. При этом расположение полос ДНК на фильтре точно соответствует их расположению в геле (реплика геля). ДНК, связанную с фильтром, можно гибридизовать с радиоактивно

меченый зондом, специфичным к определенной последовательности. В качестве такого зонда используют клонированный фрагмент ДНК, синтетический олигонуклеотид, мРНК или ее ДНК-копию. Меченный зонд гибридизуется с комплиментарной ДНК, полосы выявляют после радиоавтографии нитроцеллюлозного фильтра.

По такой же схеме на нитроцеллюлозный фильтр из агарозного геля можно перенести и молекулы РНК. Этот метод назван Северным блоттингом (Northern blotting), а перенос белков из геля на фильтры – Западным блоттингом (Western blotting). В качестве пробы в последнем анализе используют не ДНК, а иммунотела к тестируемым белкам. Три метода – мощный инструмент в детекции специфических макромолекул.

Секвенирование

После того как ген клонирован, начинается следующий этап анализа – секвенирование, или определение последовательности нуклеотидов. Последовательность нуклеотидов – определяющая характеристика гена, позволяющая дать заключение о функции.

Общий принцип. В основе секвенирования – получение фрагментов ДНК, различающихся по длине на один нуклеотид и меченых ^{32}P по 5'-концу. Молекулы разделяют электрофорезом в ПААГе. Определяется основание на конце каждого из фрагментов и устанавливается последовательность нуклеотидов.

Подвижность полос на электрофорезе обратно пропорциональна логарифму их длины: чем короче фрагмент, тем он ближе к 5'-концу.

5' A C T G A
 $^{32}\text{P}..$
 $^{32}\text{P}---$
 $^{32}\text{P}-----$
 $^{32}\text{P}-----$
 $^{32}\text{P}-----$

Исторически, для секвенирования использовали два подхода – химический и ферментативный.

Химический метод разработали А.Максам и В.Гилберт в 1976 г. Они секвенировали ДНК вириуса SV40. Процедура начинается с присоединения метки к 5' концам молекулы ДНК с помощью полинуклеотидкиназы фага T4.

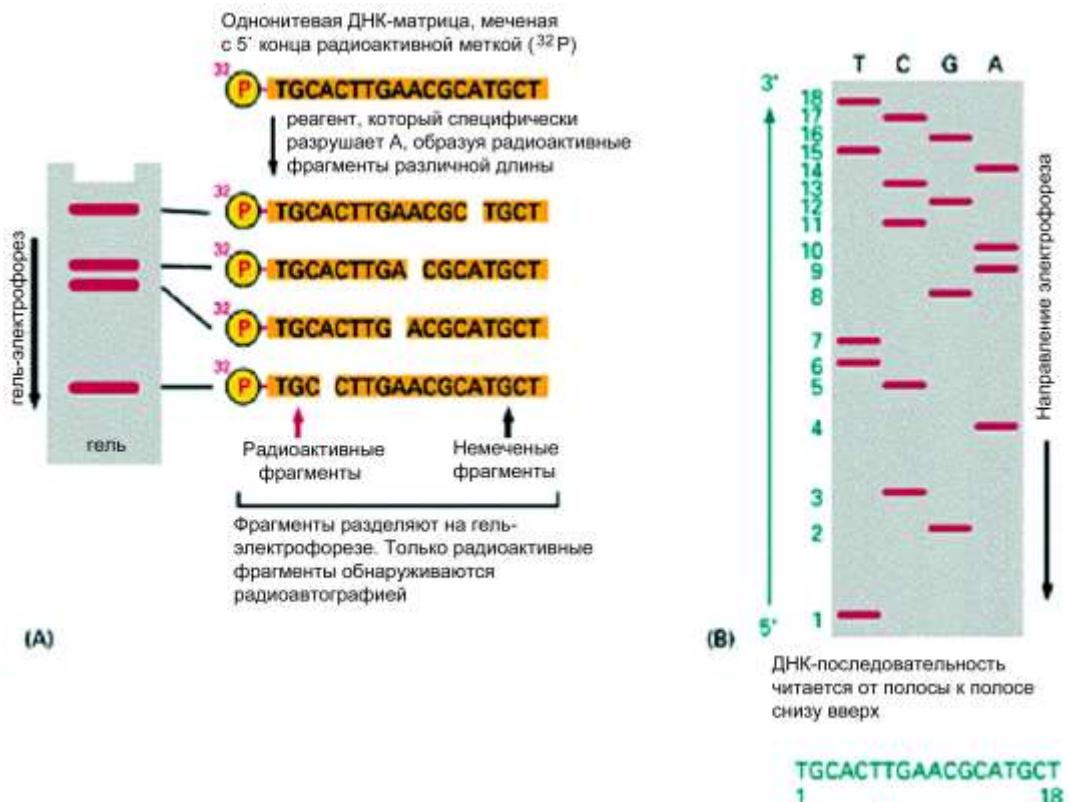


Рис. 8. Метод химического секвенирования ДНК

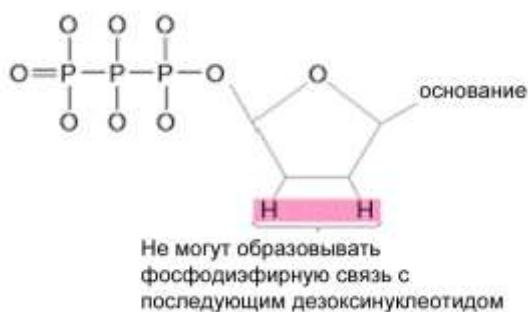
[<http://www.ncbi.nih.gov/book/Molecular Biology of the Cell/Basic Genetic Mechanisms>]

Препарат меченой ДНК делят на четыре части (Рис. 8). Каждую часть обрабатывают реагентом, разрушающим одно из четырех оснований. Экспериментально подбирается такая концентрация реагента, что на 1 молекулу ДНК приходится одно повреждение. В месте повреждения образуется разрыв. Получается набор ДНК молекул длиною от метки до разрушенного основания. Если поврежденный нуклеотид, например А, находится на расстоянии 3, 8, 9 и 13 нуклеотидов от меченого фосфора, то обработка реагентом, разрушающим А ведет к образованию фрагментов длиной 3, 8, 9 и 13 нуклеотидов.

Наборы ДНК делят электрофорезом. Радиоавтограф отражает дистанцию от метки до разрушенного основания. Чтобы определить полную

последовательность, процедура выполняется одновременно в четырех пробирках, в которых реагенты, разрушающие А, Т, С и Г. Пробирки разделяют на электрофорезе в четырех параллельных дорожках. Полосы читаются снизу вверх и следуют поочередно уровень за уровнем по любой из 4-х дорожек. Сопоставление полос на радиоавтографе позволяет читать последовательность нуклеотидов, переходя от уровня к уровню снизу вверх (5' -> 3').

Ферментативный метод (дидезоксисеквенирование). Определение нуклеотидной последовательности ДНК методом ферментативного копирования с помощью ДНК-полимеразы с остановкой удлинения цепи изобрел Ф. Сэнгер в 1977 г. Он впервые предложил применить модифицированные нуклеотиды – дидезоксирибонуклеотиды (ddNTP), у которых отсутствуют 3'- и 2'-ОН группы. Модифицированные нуклеотиды способны включаться в растущие цепи ДНК через 5'-фосфатную группу, но не способны образовывать ФДЭ-связь со следующим нуклеотидом из-за отсутствия 3'-ОН группы. Если в реакционную смесь добавляют небольшое количество модифицированных нуклеотидов, то после их встраивания в ДНК синтез прекращается и образуется набор ДНК разной длины. Таким образом, для секвенирования можно поставить четыре реакции с каждым из модифицированных нуклеотидов и разделить продукты на электрофорезе.



В основе метода дидезоксисеквенирования – реакция синтеза ДНК *in vitro*. Матрицей для полимеризации является одноцепочечная ДНК, клонированная на однонитевом бактериофаге M13. В качестве стартового праймера для секвенирования любого чужеродного фрагмента, клонированного в M13 можно использовать один и тот же олигонуклеотид, расположенный рядом со

вставкой, поскольку гетерологичную ДНК всегда клонируют в один и тот же участок M13.

Полимеризацию проводят в четырех пробирках (Рис. 9А).

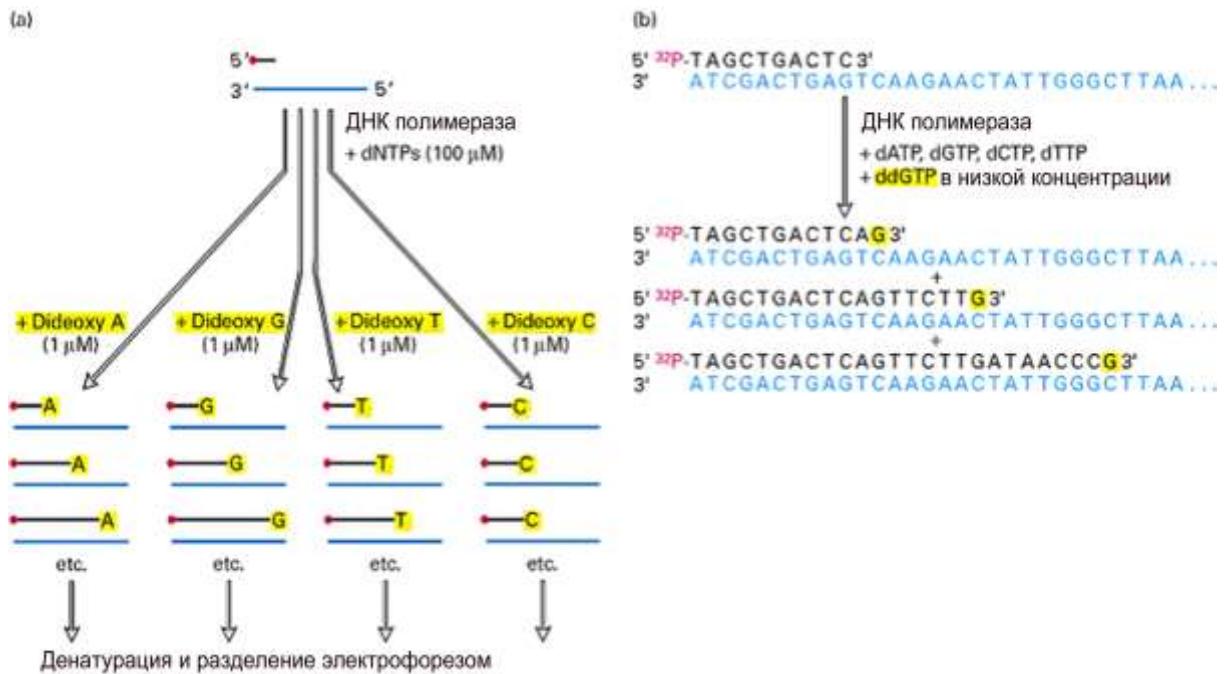


Рис. 9. Метод Сенгера для секвенирования фрагментов ДНК
[<http://www.ncbi.nih.gov/book/Molecular Cell Biology /recombinant DNA and Genomics>]

В каждой из них присутствуют ДНК-матрица, которую предстоит секвенировать, меченный праймер, ДНК-полимераза, пул нормальных нуклеотидов в избытке, один из модифицированных нуклеотидов в строго определенных соотношениях (Рис. 9Б). В каждой из четырех пробирок образуется набор фрагментов ДНК разной длины в соответствии с местом встраивания модифицированных нуклеотидов (Рис. 9А). Продукты реакций анализируют электрофорезом в четырех параллельных дорожках (в соответствии с А, Т, Г и С). Считывание радиоавтографа проводят также как и в химическом методе (рис.8).

Дидезоксисеквенированием идентифицируют первые 250-350 нуклеотидов вставки. Данные первого сиквенса используют для синтеза второго олигонуклеотидного праймера и с его помощью секвенируют следующие 250-

300 нуклеотидов. Процедуру продолжают до тех пор, пока не секвенируют весь фрагмент.

Автоматическое секвенирование включает автоматизацию проведения секвенирующих реакций и электрофоретического разделения меченых продуктов. При этом используется флуоресцентная метка. Каждый из четырех нуклеотидов метят различными флуоресцентными красителями. Содержание всех пробирок соединяют и проводят электрофорез на одной дорожке. Дорожку сканируют в луче лазера и регистрируют положение каждой флуоресцирующей полосы. Данные вводят в компьютер, который их сопоставляет с помощью специальных программ и выводит на дисплей нуклеотидную последовательность (Рис. 10).

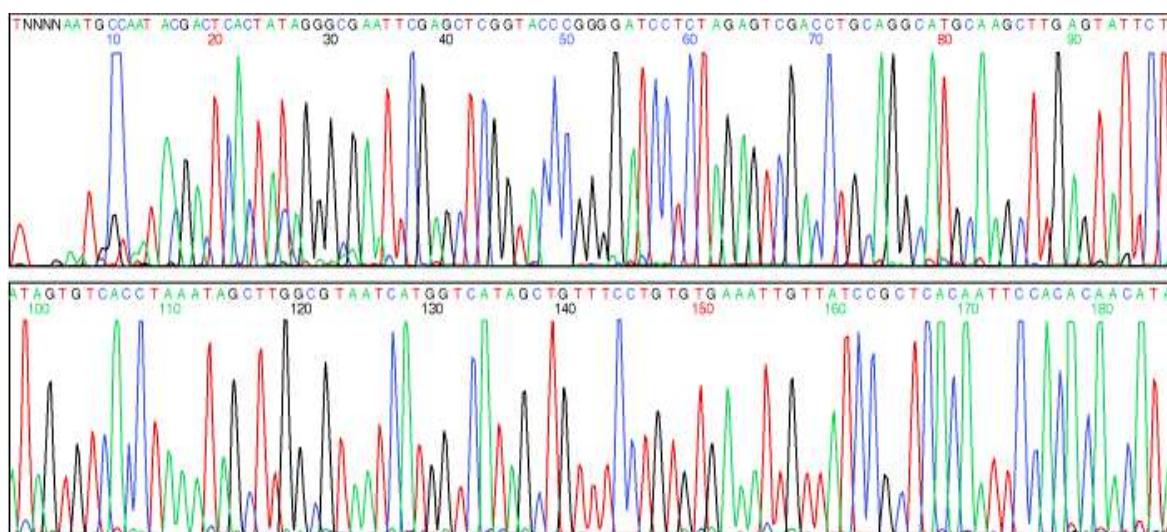


Рис. 10. Автоматическое секвенирование с помощью флуоресцентных красителей. Каждому из четырех нуклеотидов соответствует свой индивидуальный краситель [<http://www.ncbi.nih.gov/book/Modern Genetic Analysis/recombinant DNA technology>].

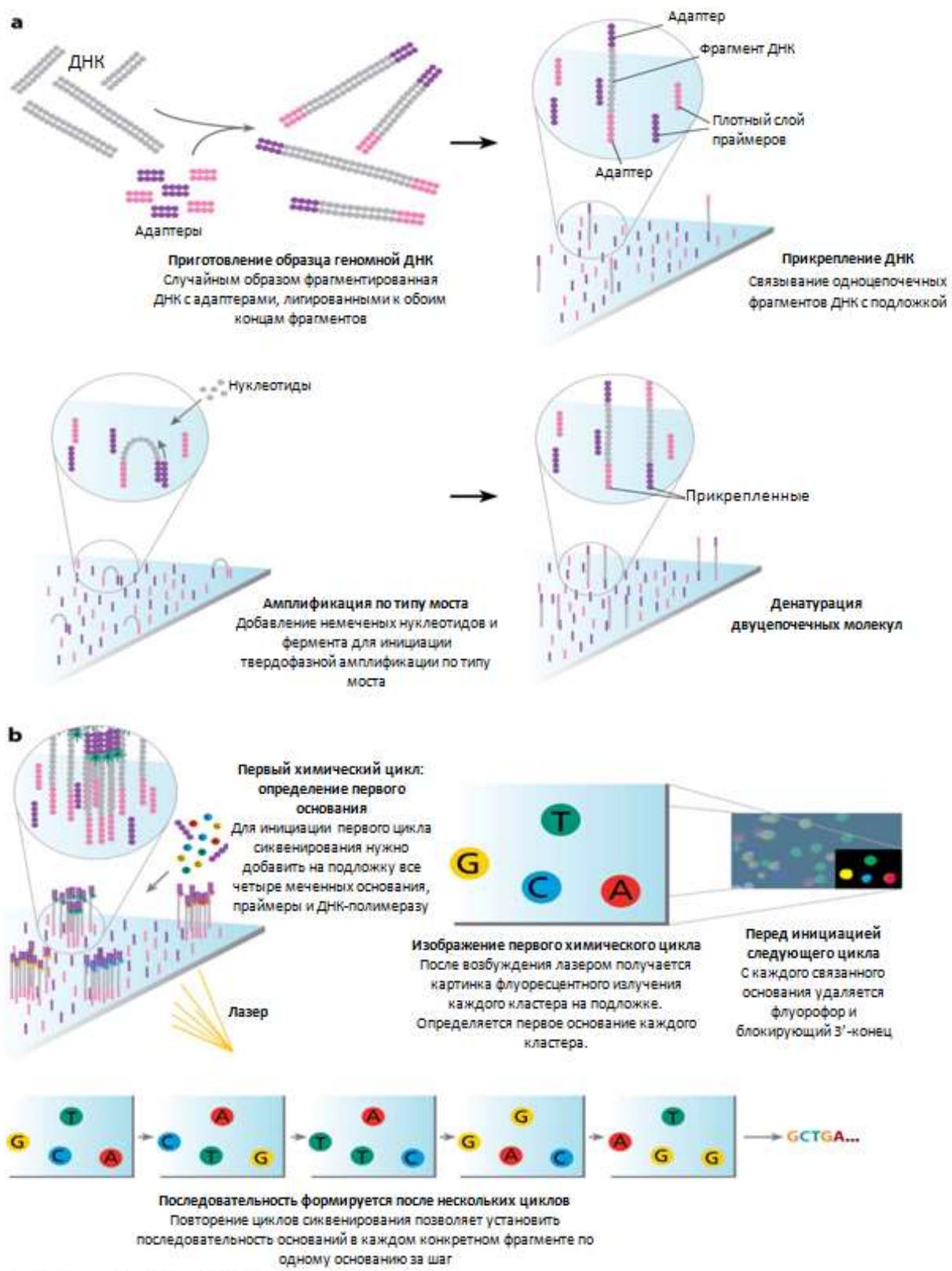
Первый автоматический ДНК-секвенатор разработан в 1987 г. фирмой Applied Biosystems (США). Позже для автоматического секвенирования наряду с пластинами использовали капиллярный гель-электрофорез. Для него характерны высокая чувствительность и высокая скорость разделения. Современные ДНК-секвенаторы существенно превосходят секвенирование

вручную, растет скорость секвенирования, постоянно улучшается техника и программное обеспечение. Это ведет к тому, что секвенирование ДНК становится простой и доступной процедурой.

При помощи сэнгеровского секвенирования расшифрован геном человека, но сейчас применяются секвенаторы нового поколения. В них участки ДНК многократно клонируются, но процесс чтения происходит по-другому. Один из новых методов - это *секвенирование* по методу Solexa (ныне Illumina) (рис. 11).

ДНК фрагментируется. К каждому участку ДНК с двух сторон добавляют адаптеры - известные небольшие последовательности нуклеотидов. Затем смесь помещается на подложку, на которой в виде решётки размещены участки ДНК, комплементарные адаптерам. Кроме того, адаптеры содержат праймеры для ДНК-полимеразы, которая осуществляет репликацию ДНК. На подложке фрагменты ДНВ многократно клонируют, получая кластеры. ДНК привязана к подложке сразу двумя концами. ДНК денатурируют. Подложка помещается в раствор, содержащий ДНК-полимеразу и помеченные нуклеотиды. После присоединения комплементарного нуклеотида лишние нуклеотиды смывают, а метки присоединившихся считывают. В технологии Illumina это флуоресцентные метки, которые можно заставить светиться разным цветом и сфотографировать. Затем ДНК обрабатывается фосфатазой и процесс повторяется. В результате на каждом цикле мы прочитываем одновременно очень большое число нуклеотидов из разных последовательностей. После секвенирования множества коротких фрагментов они собираются в единую молекулу ДНК (рис. 11).

Пиросеквенирование – определение последовательности нуклеотидов в ДНК по принципу «секвенирование путем синтеза». При включении нуклеотида во вновь синтезируемую последовательность ДНК высвобождается пирофосфат, который регистрируется посредством хемилюминесценции. Поскольку ДНК иммобилизована, растворы нуклеотидов А, С, Г и Т добавляют и отмывают поэтапно, после каждой реакции.



A Mardis ER. 2008.
R Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 9:387–402

Рис. 11. Схема Illumina-секвенирования [<http://postnauka.ru>]

Последовательность растворов, которые дают хемилюминесцентный сигнал, позволяет определить последовательность ДНК. Когда полимераза включает комплементарный нуклеотид и высвобождается пирофосфат (PPi), фермент АТФ-сульфурилаза превращает PPi в аденоинтрифосфат (АТФ) в присутствии аденоин-5'-фосфосульфата. В присутствии АТФ люцифераза превращает люциферин в оксилюциферин с высвобождением видимого света, который регистрируется и анализируется компьютерной программой. Ограничением в применении этой технологии является длина последовательности нуклеотидов, которая составляет около 300-500 нуклеотидов.

Технология пиросеквенирования лицензирована 454 Life Sciences и в настоящее время приобретена Roche Diagnostics. Метод позволяет получать информацию о 400 миллионах нуклеотидах за 10-часовой период работы на одной установке. Методология включает следующие этапы (Рис. 12).

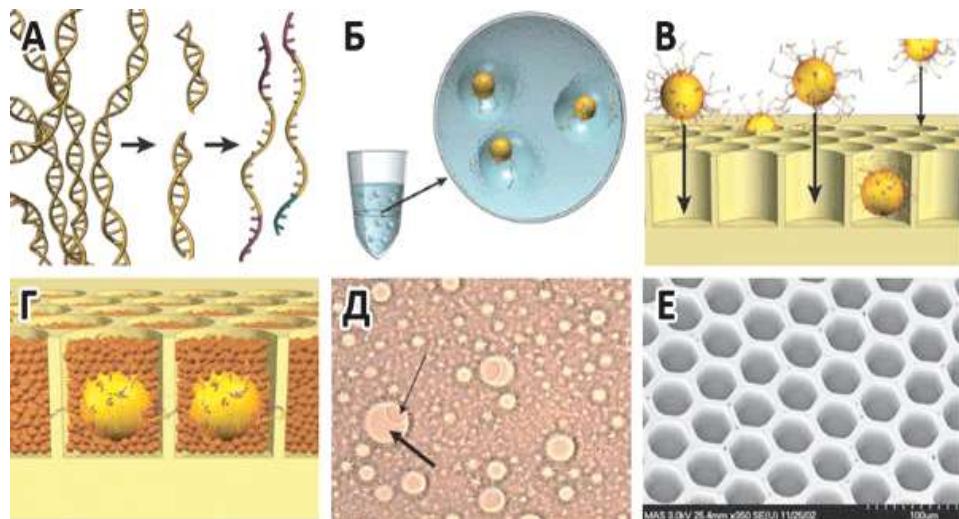


Рис 12. Схема пиросеквенирования (www.biomolecula.ru). А — ДНК фрагментируется, к фрагментам пришиваются олигонуклеотиды-«адаптеры»; полученные двуцепочечные молекулы ДНК разделяются на две комплементарные цепи. Б — Одноцепочечные молекулы ДНК прикрепляются к бусинкам в условиях, стимулирующих попадание лишь одной молекулы на бусинку. Отдельные бусинки заключаются в капли реакционной смеси, окруженные маслом. Количество молекул на бусинке увеличивается в миллионы раз в результате эмульсионной полимеразной цепной реакции (эПЦР). В — Эмульсия разбивается, и цепи ДНК-фрагментов, образовавшиеся в результате эПЦР, разделяются. Бусинки,

несущие на своей поверхности миллионы одноцепочечных копий первоначального фрагмента ДНК, помещаются в лунки оптико-волоконного слайда, по одной в каждую лунку. Г — В каждую лунку добавляются бусинки поменьше, несущие на своей поверхности ферменты, необходимые для пиросеквенирования. Д — Микрофотография эмульсии, изображающая «пустые» капли и капли, содержащие бусинки с ДНК-матрицей. Толстая стрелка указывает на 100-мкм каплю, тонкая — на 28-мкм бусинку. Е — Микрофотография фрагмента оптико-волоконного слайда, полученная при помощи сканирующего электронного микроскопа. Видна плакировка оптических волокон и пустые лунки.

ДНК, фрагментируют на кусочки по 300–500 пар оснований. Затем комплементарные цепи денатурируют, к каждой цепи фрагментов ДНК пришивают одинаковый для всех олигонуклеотид-«кадаптер», который позволяет прикрепиться на пластиковые бусинки. Смесь фрагментов ДНК разбавляют так, что каждая бусинка получает по одной индивидуальной цепи. Затем каждая бусинка оказывается заключённой в капельку, окруженную маслом и содержащую смесь для полимеразной цепной реакции, которая проходит в каждой капельке эмульсии (эмulsionная ПЦР). Это приводит к «клональной амплификации» цепей ДНК, на поверхности бусинки удерживается уже не одна, а около 10 млн копий («клонов») уникальной ДНК-матрицы. Далее двуцепочечные фрагменты ДНК, образовавшиеся в ходе ПЦР, разделяются и бусинки, несущие одноцепочечные копии ДНК-матрицы, помещают в лунки. Каждая лунка - это отдельный пиколитровый «реактор», в котором идет реакция секвенирования. Происходит поочередное добавление и удаление реагентов и продуктов реакции. Помимо бусинок с ДНК-матрицей, в каждую лунку добавляют более мелкие бусинки с иммобилизованными на поверхности ферментами, необходимыми для пирофосфатного секвенирования. Нуклеотиды подаются последовательно в проточную камеру, куда помещается слайд с лунками. Когда определённый нуклеотид встраивается в растущую цепь ДНК в лунке высвобождается молекула пирофосфата, которая является предшественником компонента другой ферментативной реакции. Её катализирует фермент - люцифераза светлячка *Photinus pyralis*. Для её

осуществления необходим аденозинтрифосфат (АТФ). Пирофосфат превращается в АТФ под действием фермента АТФ-сульфурилазы. В присутствии АТФ фермент люцифераза окисляет люциферин до оксилюцифера, эта реакция сопровождается хемилюминесценцией (вспышкой света), которая регистрируется для каждой индивидуальной лунки, в которой произошло встраивание известного нуклеотида.

Стремительно развиваются другие подходы. Платформа SOLiD (Supported Oligonucleotide Ligation and Detection System 2.0), разработанная Applied Biosystems — технология секвенирования коротких чтений, основанная на лигировании. По технологии SOLiD при секвенировании фрагменты ДНК лигируются на олигонуклеотидные адаптеры, прикрепленные к шарикам, далее они амплифицируются с помощью эмульсионной ПЦР.

Одномолекулярное секвенирование Helicos Biosciences - метод секвенирования единичных молекул, разработанный HeliScope (Helicos BioSciences) даёт информации 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 (Single molecule real time sequencing, SMRT) основано на наблюдении за работой единичной молекулы ДНК-полимеразы. Использование четырех флюоресцентно меченых нуклеотидов позволяет определить какой нуклеотид присоединяет ДНК-полимераза в данный момент времени.

Ion Torrent Sequencing - Метод основан на связи между химической и цифровой информацией, что позволяет быстро секвенировать большое количество образцов. Технология также называется pH-индуцированным секвенированием. Процесс основан на детекции протонов, которые получаются при синтезе цепи ДНК как побочный продукт. Как следствие, pH раствора меняется, что и детектируют. Платформа Ion Torrent отличается от остальных

технологий секвенирования тем, что в ней не используются модифицированные нуклеотиды и оптические методы. Метод Ion Torrent позволяет исследовать транскриптомы, малые РНК, проводить ChIP-seq. Более того, с его помощью можно изучать геномы микробных сообществ.

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.

После сиквенса проводят поиск открытой рамки считывания (ORF) – последовательности, ограниченной старт- и стоп-кодонами. Выбор зависит от того, какое сочетание из трех нуклеотидов выбрано в качестве первого кодона. Возможны три рамки считывания одной и той же нуклеотидной последовательности. Кроме того, последовательность всегда читается в 5' -> 3' направлении, а значит, что в целом для одной последовательности возможны 6 различных рамок считывания (Рис. 13).

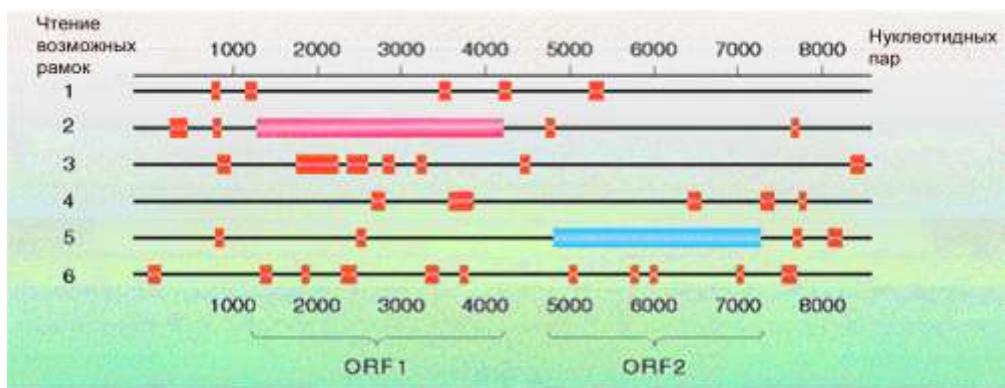


Рис. 13. Сканирование последовательности 9 кб-фрагмента ДНК выявило две большие ORF, 1 and 2, которые являются потенциальными генами [http://www.ncbi.nih.gov/book/Modern Genetic Analysis/ recombinant DNA technology].

Поиск проводят с помощью компьютерных программ, одна из них ORF Finder, расположена на сервере <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/goft>. Проводят поиск гомологии последовательности с последовательностями, хранящимися в базах данных. Выравнивание и сравнительный анализ проводят с помощью

алгоритма программы BLAST, расположенной на сервере Национального института здоровья.

Растущее число секвенированных последовательностей заставило мировое сообщество задуматься об упорядочении их хранения. В 1982 г. на основе Национального института здоровья (NIH) был организован банк данных GenBank, его сервер в интернете: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. GenBank содержит информацию, собранную со всего мира. В 1980 г. в Европе была создана база данных EMBL Data Library. Принцип обеих – обеспечение доступа к опубликованным нуклеотидным последовательностям, создание новых программных продуктов для информационного обеспечения исследований. Наряду с базами для генов, имеются базы хранения аминокислотных последовательностей, крупнейшей является SWISS-PROT. Базы для белков имеют компьютерное обеспечение, позволяющее сравнивать белки и продукты вновь секвенированных генов, на основании чего делается заключение о функции кодируемого геном продукта.

Четыре центра, включающие все известные последовательности ДНК, образуют глобальную сеть: National Center for Biotechnology Information (NCBI) содержит банк данных GenBank; European Bioinformatics Institute (EBI) содержит банк данных EMBL; Center for Informatio Biology (CIB) содержит DNA Databank of Japan (DDBJ). National Center for Genome Resources содержит Genome Sequence Database (GSDB). Банки обмениваются поступающими в них данными, что является основой единой мировой глобальной базы данных последовательностей. Каждая новая последовательность ДНК попадает в GenBank, EMBL, DDBJ или GSDB, а после обмена информацией между этими банками появляется в каждом из них. Каждой новой последовательности ДНК приписывается уникальный номер. Последовательности в банках данных сопровождаются аннотацией, содержащей всю известную биологическую информацию о последовательности (организм, кодируемый белок, положение инициирующего и терминирующего кодонов, инtronов/экзонов и т.д.), а так же имя автора, название публикации, журнал, год, выпуск, страницы и пр.

Система полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) представляет собой амплификацию или размножение специфического сегмента ДНК с помощью ДНК-полимеразы, т.е. это способ получения большого числа копий гена или специфических последовательностей ДНК *in vitro*. Метод разработан в 1985 г. К.Маллисом с сотрудниками. Процедура включает три этапа: денатурация, отжиг и синтез (Рис. 12). К исследуемому образцу ДНК добавляют в избытке два синтетических праймера. Праймеры – это олигонуклеотиды длиной 20 оснований, которые комплементарны участкам ДНК из противоположных цепей и ограничивают последовательность-мишень. Их 3'-ОН концы после отжига должны быть ориентированы навстречу друг другу. Длина ДНК-мишени, заключенная между двумя направленными навстречу друг другу праймерами, может варьировать от 100 до 30000 п.о. Препарат ДНК подвергают термической денатурации при нагревании до 95°C (1 мин). В процессе отжига (ренатурации) при понижении температуры до 55°C происходит эффективная гибридизация праймеров с комплементарными последовательностями на разных цепях ДНК (Рис. 14). При этом отжиг происходит преимущественно между праймерами и цепочками ДНК, чем между длинными цепочками ДНК. Поэтому в реакционной смеси должен быть избыток праймеров. Далее температуру повышают до 75°C – оптимальная температура для *Tag*-полимеразы. В присутствии избытка дезоксинуклеозидтрифосфатов и ДНК-полимеразы начинается реакция полимеризации, инициируемая на праймерах. На этом первый цикл завершается. После остановки реакции ДНК снова денатурируют нагреванием. В процессе охлаждения праймеры вновь эффективно гибридизуются, причем не только с цепями исходной ДНК, но и с вновь синтезированными. В первом раунде каждая из новосинтезированных цепей, ограниченная праймером с одной стороны, имеет большую длину, чем расстояние между праймерами. Такие цепи называют «длинными матрицами». Во втором раунде матрицами служат исходная и новосинтезированная ДНК.

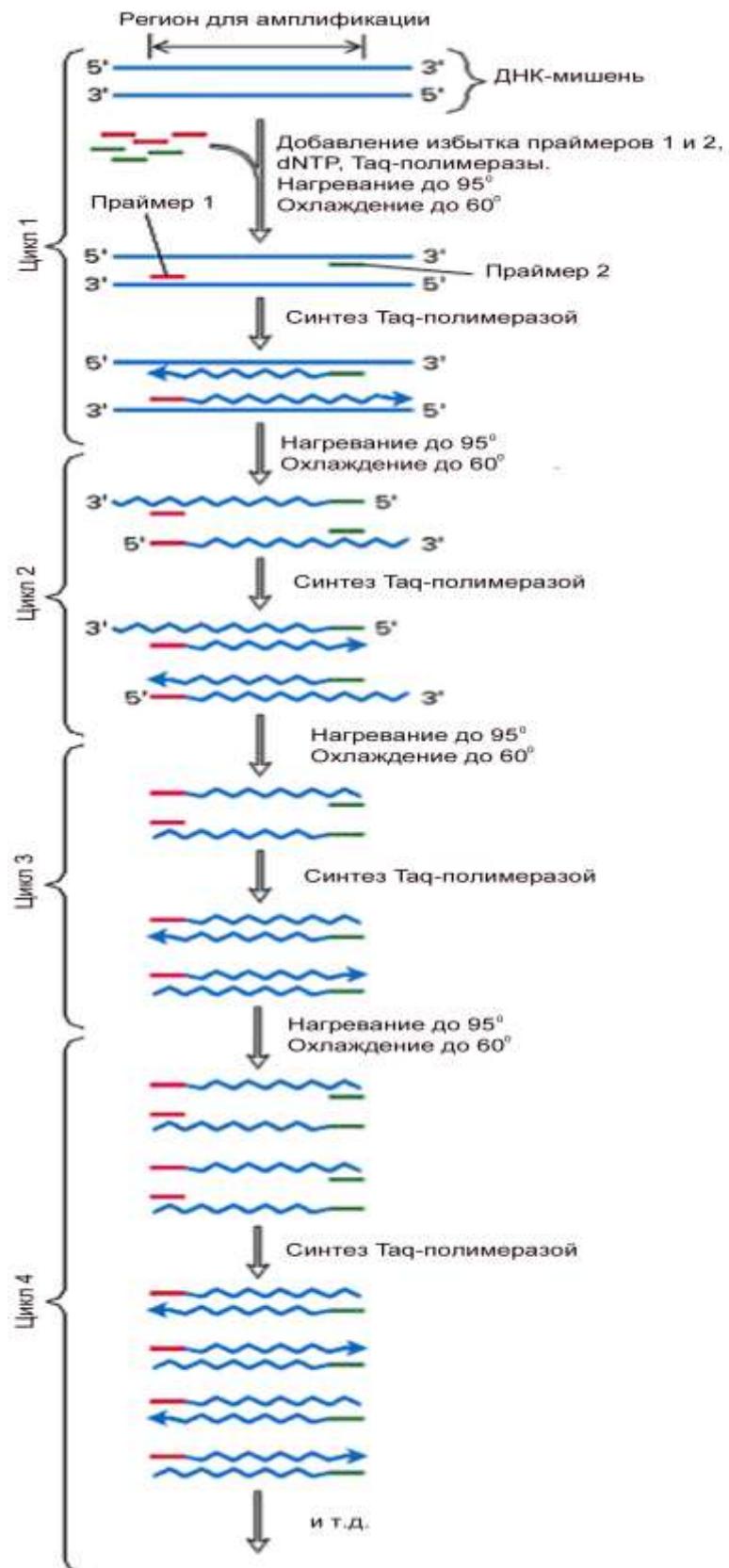


Рис. 14. Полимеразная цепная реакция [http://www.ncbi.nih.gov/book/Molecular_Cell_Biology/recombinant_DNA_and_Genomics]

Образуются как «длинные», так и «короткие матрицы», которые ограничены с двух сторон заданными праймерами. В третьем и последующих раундах «коротких матриц» становится все больше и к 30-му раунду их число уже в 10^6 раз превышает число исходных цепей. За 20-30 циклов количество копий гена увеличивается в 10^6 - 10^9 раз.

Первоначально для ПЦР использовали фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Однако после каждого цикла необходимо было вносить в реакционную смесь новую порцию фермента. Решающим фактором для развития ПЦР стало открытие термостабильной ДНК-полимеразы, способной выдерживать многократные нагревания и охлаждения. Это *Tag*-полимераза из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*. С использованием этого фермента отпала необходимость добавлять фермент после каждого цикла реакции. Это позволило автоматизировать процедуру. Реакцию проводят в программируемом термостате, где смена температур происходит автоматически. На один цикл уходит от 3 до 5 мин. Сейчас стали применять *Pfu*-полимеразу из архебактерий *Pirococcus furiosus*, живущих в морских кратерах при 100°C. Фермент проводит синтез корректнее, чем *Tag*-полимераза.

Полимеразная цепная реакция позволяет также амплифицировать молекулы РНК. На первом этапе с помощью обратной транскриптазы (ОТ) получают ДНК-копию целевой РНК, а затем осуществляют ПЦР. Метод называется ОТ-ПЦР. На основе ПЦР в 1988 г. А.Белянский и К. Раевский предложили способ амплификации молекул кДНК *in vitro*. Чтобы молекулы кДНК могли участвовать в амплификации, необходимо наличие общих последовательностей на обоих концах всех молекул кДНК. Первая реакция будет инициироваться поли(T)-праймером, комплементарным поли(A)-последовательности мРНК. После синтеза первой цепи кДНК к ее 3'-концу с помощью терминальной трансферазы достраивают олиго(dG)-конец. РНК из образованного дуплекса удаляют щелочным гидролизом, после чего одноцепочечная матрица готова к амплификации с использованием двух праймеров: (T)- и (G)-олигонуклеотидов.

Так на основе суммарной мРНК были сконструированы представительные библиотеки кДНК.

Другая разновидность ПЦР заключается в одновременной амплификации сразу нескольких генетических локусов. В этом случае используют более одной пары олигонуклеотидных праймеров. Такая реакция получила название мультиплексная ПЦР (МПЦР).

Олигонуклеотидные микрочипы. Метод олигонуклеотидных микрочипов (microarray) разработан акад. А.Мирзабековым. Олигонуклеотиды с известной последовательностью иммобилизуют на твердом носителе в строго определенном порядке и получают микрочипы - микроматрицы, содержащие на небольшой поверхности в несколько см² тысячи индивидуальных проб для последующей гибридизации. Исследуемые препараты ДНК, предназначенные для гибридизации на микрочипе, флуоресцентно метят, обычно в процессе ПЦР. После гибридизации и отмычки микрочип анализируют с помощью лазерного сканера. Данные флуоресценции каждой ячейки микрочипа подвергают компьютерной обработке с программным обеспечением. Секвенирование многочисленных кДНК и полных геномов создало базу для получения микрочипов, позволяющих одновременно изучать экспрессию большого числа генов на уровне целого генома. Были созданы микроматрицы с нанесенными в строгом порядке образцами ПЦР-фрагментов кДНК для тысяч генов человека и других организмов. Часто создают специализированные микрочипы для анализа экспрессии определенных типов генов: контролирующих клеточный цикл, апоптоз, трансляцию, факторы транскрипции и др. Например, Т.Шенк с сотрудниками (1998 г.), используя четыре микрочипа, содержащих в сумме фрагменты кДНК для 6600 генов человека, изучили, как инфицирование вирусом человека влияет на экспрессию этих генов. Оказалось, что вирусная инфекция (цитомегаловирус) изменяет экспрессию 258 генов. Технология ДНК-микрочипов рассматривается как наиболее перспективная в диагностической практике. Будут созданы микроматрицы для одновременного выявления большинства известных

инфекций (вирусов, бактерий, простейших и т.д.). Проведение такого масштабного экспресс-анализа другими методами невозможно.

ПЦР в реальном времени или *количественный ПЦР* – метод основан на полимеразной цепной реакции с одновременным измерением количества вновь синтезируемых молекул ДНК. Определение выхода продукта ПЦР осуществляется после каждого цикла амплификации. По данным строится кинетическая кривая, которая позволяет определить относительную концентрацию ДНК. Используют два подхода: применение интеркалирующих флуоресцентных агентов, свечение которых возрастает при связывании с днДНК и использование меченых флуоресцентными агентами олигонуклеотидных проб, комплементарных участку PCR-продукта. Интеркалирующий краситель связывается с днДНК и вызывает свечение, которое регистрирует прибор. В технологиях *TaqMan*, *Molecular Beacons* и *LightCycler* используют меченные олигонуклеотидные пробы. Принцип *TaqMan* основан на использовании 5'-экзонуклеазной активности ДНК полимеразы. В реакционную смесь добавляют ДНК-зонды с флуоресцентной меткой в 5'-положении и гасителем флуоресценции в 3'-положении. При отжиге праймеров происходит присоединение ДНК-зонда к комплементарной цепи ДНК (Рис. 15).

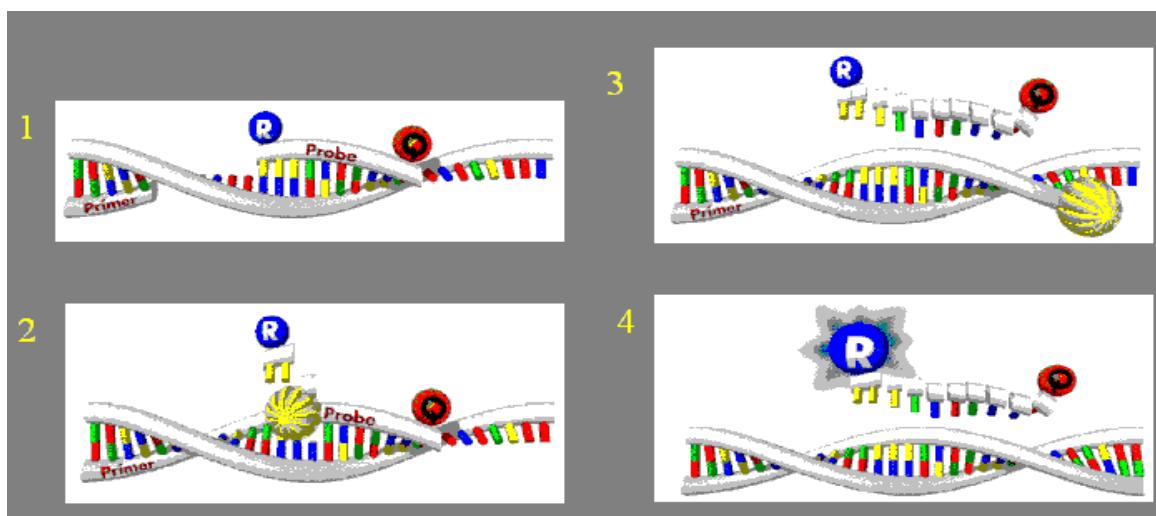


Рис. 15. Схема ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan: R- флуоресцентный краситель, Q- гаситель.

Во время элонгации полимераза синтезирует комплементарную цепь ДНК и при достижении зонда начинает его расщеплять благодаря 5'-экзонуклеазной активности. Происходит разъединение метки и гасителя, что приводит к увеличению свечения.

Принцип Molecular Beacons отличается от *TaqMan* тем, что концы пробы, на которых находятся метка и гаситель флуоресценции комплементарны друг другу. При температуре отжига праймеров они комплементарно взаимодействуют, зона комплементарности находится в петле (Рис. 16).

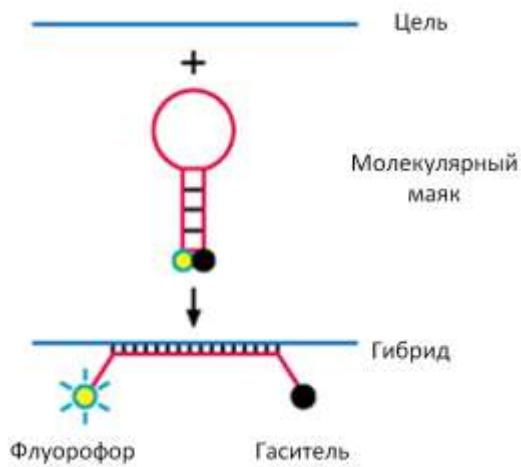


Рис. 16. Схема ПЦР в реальном времени по технологии Molecular Beacons.

При гибридизации пробы с матрицей вторичная структура разрушается, метка и гаситель расходятся и определяют уровень флуоресценции.

LightCycler отличается повышенной специфичностью, увеличение флуоресценции происходит при связывании с ДНК сразу 2-х зондов (Рис. 17).

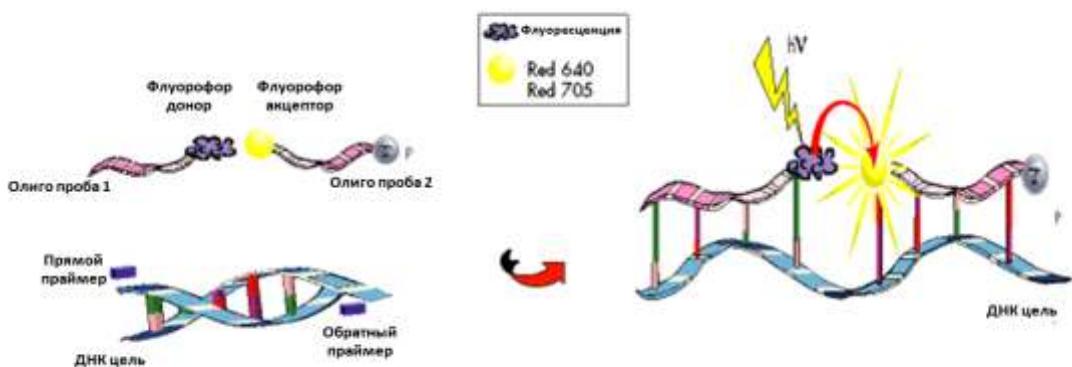


Рис. 17. Схема ПЦР в реальном времени по технологии Light Cycler

Принцип метода в переносе энергии от метки первого зонда на метку второго, расстояние между которыми 1-3 нуклеотида. При связывании зондов с ДНК матрицей излучение, испускаемое первым флуорофором передается на второй флуорофор, а его излучение детектируется прибором.

На кривой, которая описывает процесс амплификации, выделяют три стадии (рис. 18): Экспоненциальная (в каждом цикле происходит удвоение продукта), линейная: компоненты реакции расходуются, реакция замедляется, и продукты начинают разрушаться, плато: реакция остановилась, продукты больше не синтезируются. В течение экспоненциальной фазы процесс отражает количество синтезированной последовательности. Как только условия амплификации лимитируются (инактивация фермента, наличие ингибиторов – пирофосфатов, обедненность буфера) кривая выходит на плато. Именно в этих условиях определяется количество продуктов реакции в условиях гель-электрофореза.



Рис. 18. Кривая амплификации ДНК в режиме реального времени. Описание в тексте.

Направленный мутагенез молекул ДНК *in vitro*

Делекции и вставки. Доступный и часто используемый метод получения делекций – расщепление молекулы ДНК рестриктазой, которая имеет более одного участка узнавания, с последующим лигированием расщепленного

препарата ДНК. При этом часть молекул ДНК будет укорочена в результате выщепления одного или нескольких рестрикционных фрагментов.

Другой метод получения делеций *in vitro* – расщепление ДНК в определенном участке рестриктазой с последующей обработкой экзонуклеазой, которая гидролизует молекулу ДНК с обоих концов. Так получают наборы более коротких линейных молекул, которые после лigation дают наборы кольцевых ДНК с делециями.

Встраивание (инсерция) экзогенной ДНК (природной или синтетической) осуществляют после получения случайных или направленных двухцепочечных разрывов. Разрывы получают путем кратковременной обработки панкреатической ДНКазой или рестриктазой. Затем проводят лigation гетерологичных ДНК. Так был получен первый гибридный фаг M13.

Вводя делеции или инсерции *in vitro* можно изучать функции индивидуальных генов. На этом принципе основан метод *генного нокаута*. Протяженные делеции или инсерции в кодирующей области гена обычно приводят к нарушению рамки считываания и нарушают экспрессию гена.

Олигонуклеотид-направленный (сайтспецифический мутагенез) in vitro. Метод был разработан для одноцепочечной кольцевой ДНК фагов известной последовательности. Одноцепочечную ДНК гибридизуют с синтетическим олигонуклеотидом, несущим генетические модификации по сравнению с исходной последовательностью, например, точечную замену одного из нуклеотидов. Олигонуклеотид используется в качестве инициирующего праймера для синтеза второй цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Полученную двухцепочечную ДНК обрабатывают нуклеазой S1 для гидролиза двухцепочечных молекул и ими трансфецируют клетки *E. coli*. При репликации образуются фаги как дикого типа, так и мутантные. Метод получил дальнейшее развитие для нитевых фагов и плазмид. При этом плазмидную ДНК необходимо перевести в одноцепочечную кольцевую форму. Для точечной замены праймер должен содержать до двух-трех комплементарных нуклеотидов на 3'-конце и шести-семи – на 5'-конце от некомплементарного

нуклеотида. Если участок модификации увеличивается, размер синтетического олигонуклеотида возрастает. Поскольку ДНК-полимераза не всегда эффективно достраивает вторую цепочку ДНК, применяют метод с использованием двойных праймеров, либо кольцевой двухцепочечной ДНК с одноцепочечной брешью. При этом увеличивается выход синтезированных молекул двухцепочечной ДНК.

Появление ПЦР значительно упростило процедуру введения мутаций в последовательность ДНК. С помощью программ рассчитываются последовательности олигонуклеотидных праймеров, которые содержат не только точечные мутации, но позволяют одновременно вводить участки узнавания рестриктаз, необходимые для запланированной встройки в клонирующий вектор. На введении в последовательность участков узнавания рестриктаз основана технология *кассетного мутагенеза*. В непосредственной близости от предполагаемого места введения мутации с 5'- и 3'-стороны олигонуклеотид-направленным мутагенезом вводят сайты узнавания рестриктаз. Полученную плазмиду гидролизуют и добавляют смесь синтетических двухцепочечных сегментов, которые после встройки восстанавливают последовательность гена, за исключением триплета, кодирующего определенную аминокислоту. После трансформации клеток бактерий *E. coli* секвенированием идентифицируют плазмиды, содержащие замены данного триплета.

Такой подход был реализован для введения сайтспецифичных мутаций в ген субтилизина *B. subtilis*. Путем кассетного мутагенеза получили 19 вариантов субтилизина, у которых Met222 был замещен всеми другими аминокислотами. Оказалось, что единичная замена Met222 на другие аминокислоты приводит к вариациям в ферментативной активности от 0,3 до 138% от уровня удельной активности нативного фермента. Замена Met222 на Ala, Ser, Cys значительно повышает устойчивость субтилизина к воздействию химических окислителей. Таким образом, методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза можно создавать ферменты, имеющие повышенную удельную активность,

термостабильность, устойчивость к окислительной инактивации, а также измененную специфичность взаимодействия с макромолекулами. Это имеет особое значение для практического использования бактериальных ферментов.

Многие белки эукариот, клонированные в бактериальных векторах, имеют доменную структуру. Введение сайтов рестрикции в участки гена, фланкирующие отдельные домены, позволяют менять эти домены на гетерологичные, т.е. конструировать белки с новыми свойствами.

Другой подход для создания новых белков – *получение гибридных генов*, кодирующих гибридные (химерные) интерфероны. Методами генной инженерии созданы многочисленные суперпродуценты интерферонов человека. Эти препараты и их смеси интенсивно используются в медицине для модуляции иммунного ответа организма. Оказалось, что гибридные формы имеют значительно большую антивирусную активность по сравнению с исходными формами. Разработан метод, позволяющий получать гибридные гены интерферона, которые образуются в результате рекомбинации клонированных генов *in vivo*. Были использованы гены мышиных интерферонов альфа-1 и альфа-4. Эти белки различаются по последовательности лишь на 20% и имеют существенные отличия по противовирусной активности. Оба гена встраивали в одну векторную плазмиду, переводили в линейную форму и трансформировали в клетки *E. coli* *recA+*. После рекомбинации отбирали гибридные плазмиды. Области кроссинговера в гибридных плазмидах устанавливали с помощью рестрикционного анализа. Некоторые из гибридных интерферонов имели противовирусную активность гораздо более высокую, чем исходные белки. Таким образом, данное направление исследований перспективно для медицинской и ветеринарной практики.

Успехи в разработке методов направленного мутагенеза привели к тому, что эти процедуры могут применяться практически в любой молекулярно-биологической лаборатории. Эти методы стали неотъемлемой частью современных исследований в различных областях биологии.

Геномы микроорганизмов

Разработка информационных технологий, методов клонирования и секвенирования создали базу для определения нуклеотидных последовательностей крупных молекул ДНК хромосом. В 1978 г. Ф.Сэнгер с соавторами впервые опубликовали первую полную последовательность бактериофага ϕ X174 (5386 пн). Вслед за этим были секвенированы геномы различных бактериофагов и вирусов. В 1995 г. секвенирован *первый* бактериальный геном хромосомы *Haemophilus influenzae* (Табл. 2).

Таблица 2. Геномы патогенных микроорганизмов

Организм	Вызываемое заболевание	Размер генома, млн пн	Год публикации
<i>Haemophilus influenzae</i>	Менингит, пневмония	1,8	1995
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Туберкулоз	4,4	1998
<i>Campylobacter jejuni</i>	Диарея	1,6	2000
<i>Escherichia coli</i> 0157	Пищевое отравление	5,5	2000
<i>Vibrio cholerae</i>	Холера	4,0	2000
<i>Mycobacterium leprae</i>	Проказа	3,3	2000
<i>Neisseria meningitidis</i>	Менингит	2,3	2000
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Пневмония	1,23	2000
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Пневмония	2,2	2001
<i>Yersinia pestis</i>	Чума	4,7	2001
<i>Salmonella typhi</i> (CT18)	Брюшной тиф	4,5	2001
<i>Brucella melitensis</i>	Бруцеллез	3,3	2002
<i>Shigella flexneri</i>	Дизентерия	4,6	2003
<i>Bacillus anthracis</i>	Сибирская язва	4,5	2003
<i>Legionella pneumophila</i>	Легионеллез	3,5	2004
<i>Bacillus cereus</i>	Токсикоинфекции	5,3	2004
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Псевдотуберкулез	4,8	2004
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Скарлатина, гноеродные инфекции	1,9	2004
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Гонорея	2,1	2005
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Гноеродные инфекции	6,4	2005
<i>Aspergillus oryzae</i>	Грибковая инфекция	37	2005
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Грибковая инфекция	29,3	2005
<i>Rickettsia bellii</i>	Сыпной тиф	5,065	2006
<i>Staphylococcus aureus</i>	Гноеродные инфекции	2,9	2006

Геном характеризовался низким содержанием GC пар (38%). Из 1743 открытых рамок считывания 736 - гены с неизвестной функцией. 78% ORF *H. influenzae* имеют гомологию с генами других организмов. В 1997 г. усилиями мирового сообщества секвенирован геном *E. coli* K-12 (4639221 пн). Содержание GC-пар составило 50,8%. 87,8% генома занимают белок-кодирующие гены, 0,8% - гены, кодирующие РНК, 0,7% - некодирующие повторы. Анализ выявил 4288 потенциальных ORF, из которых 38% кодируют белки с неизвестной функцией. Стартовыми кодонами являются ATG (3542 ORF), GTG (612), TTG (130). Частота встречаемости терминирующих триплетов: TAA (2705), TGA (1257), TAG (326). Для 405 генов показано перекрывание стартового и терминирующего триплетов.

Секвенирование полного генома *B. subtilis* 168 осуществлено в 1997 г. Размер генома – 4214814 пн, геном содержит 4290 генов, содержание GC-пар – 43,5%.

Развитие геномных проектов прокариот направлено, прежде всего, на секвенирование и анализ геномов патогенных микроорганизмов (Табл. 1) и вирусов. Такая информация является приоритетом современной геномики. Эти данные способствуют формированию наших знаний о взаимодействии двух геномов, генома патогена и генома клетки-хозяина, что позволит выявить защитные механизмы, которые формируются в организме в ответ на конкретную инфекцию. С другой стороны, накапливаются данные о молекулярных механизмах патогенного действия микроорганизмов. На основе этих знаний с помощью методов генной инженерии, протеомного анализа и информационных технологий ожидается разработка диагностикумов и препаратов нового поколения для лечения различных инфекционных заболеваний. В последние годы широкую значимость приобрели проекты по метагеномному секвенированию, которые позволяют выяснить весь арсенал живых организмов, существующих в определенной экологической нише и определить пути их взаимодействия.

Генетическая инженерия дрожжей

Дрожжевые клетки для экспрессии эукариотических генов используют по следующим причинам. Во-первых, дрожжи – это одноклеточные эукариоты, генетика и физиология которых хорошо изучены, геном дрожжей секвенирован, их можно культивировать в условиях лаборатории и в биореакторах. Во-вторых, в качестве векторных молекул могут использоваться природные плазмиды дрожжей, также клонированы и охарактеризованы сильные дрожжевые промоторы. В-третьих, в клетках дрожжей посттрансляционные модификации аминокислотных остатков белков (гликозилирование, формирование -S-S- мостиков и др.) осуществляются как у эукариот, прокариоты из-за отсутствия соответствующих ферментных систем не способны проводить такие реакции. Четвертое, дрожжи способны секретировать гетерологичные белки в среду, что облегчает процесс очистки. В-пятых, дрожжи используются в пищевой промышленности и признаны безопасными микроорганизмами. Поэтому процедура допуска при использовании дрожжей для получения медицинских препаратов, существенно упрощена. Также важно, что компоненты и продукты метаболизма дрожжей признаны нетоксичными для человека. Для работы с дрожжами используют различные вектора клонирования. Большинство из них – бинарные векторы, которые реплицируются в дрожжах и бактериях. При этом основные манипуляции удобнее проводить в клетках, например, *E.coli*, а конечные конструкции переносить в дрожжи, чтобы использовать свойства этого хозяина, например, гликозилирование.

В основе большинства дрожжевых векторов – природные дрожжевые плазмиды. Они называются 2-мкм (2 μ)-плазмиды, они имеют одну дрожжевую *ori*-последовательность, их содержат большинство штаммов дрожжей. Размер этих плазмид составляет в среднем 6.3 кб, количество достигает 50 копий на клетку. Типичный вектор на основе дрожжевой плазмиды – это вектор экспрессии. Дрожжевые клетки не способны эффективно вырезать интроны, поэтому для клонирования в дрожжевые плазмиды используют либо кДНК,

либо ДНК, синтезируемую химическим путем. кДНК встраивают между дрожжевым промотором и дрожжевым сигналом терминации транскрипции (терминатором). В качестве маркерного гена дрожжевой вектор экспрессии содержит собственный ген биосинтеза лейцина (LEU2). Этим вектором трансформируют штаммы дрожжей, не способные синтезировать лейцин (штаммы ауксотрофы по лейцину) и высевают на среду без лейцина. Вырастают клетки, содержащие плазмиды.

Первый шаг на пути оптимизации экспрессии в дрожжах – это выбор промотора. Дрожжевые промоторы отличаются от бактериальных: у дрожжей ТАТА-бокс расположен значительно дальше (40-120 п. о.) от точки инициации транскрипции синтеза белка (у *E. coli* – это область -10). Кроме того, дрожжевые промоторы функционируют вместе с активаторами 100 – 1000 п.о. от сайта инициации транскрипции (+1). Поэтому дрожжевые векторы содержат длинную регуляторную область, до 1 кб. В качестве сильных дрожжевых конститутивных промоторов используют промоторы дрожжевых генов алкогольдидрогеназы и триозофосфатдегидрогеназы, в качестве сильных индуцибельных промоторов – промоторы генов катаболизма галактозы. Эти промоторы активируются галактозой и репрессируются глюкозой. У высших эукариот сайты терминации транскрипции и полиаденилирования расположены на расстоянии нескольких сотен нуклеотидов друг от друга. У дрожжей иначе: полиаденилирование происходит очень близко к 3'-концу транскрипта. Поэтому для эффективной экспрессии в дрожжах вслед за чужеродным геном встраивают дрожжевой сайт терминации транскрипции. Если за кодирующей областью нет терминирующей последовательности, то не образуется стабильная мРНК из-за отсутствия сайта, подходящего для полиаденилирования. Таким образом, подстиковка дрожжевого терминатора транскрипции необходима для повышения стабильности мРНК.

Следующее требование для экспрессии – это эффективная трансляция. Для этого необходимо распознавание факторами инициации участка инициации трансляции AUG-кодона. В бактериях это связывание последовательности

Шайно-Дальгарно с комплементарным участком 16SPHK. У дрожжей, как и остальных эукариот, нет таких последовательностей. AUG у дрожжей находится в окружении A и U, тогда как гуанин не встречается на протяжении 20-40 пар оснований, предшествующих кодону. Присутствие гуанина в этой области влечет остановку инициации трансляции. Трансляция также ингибитируется, если в 5'-нетранслируемой области имеются петлевые структуры.

Используют следующие основные вектора клонирования.

Интегративные плазмиды дрожжей – это бактериальные плазмиды, интегрированные в дрожжевую геном (рис. 19а). Эти вектора не содержат дрожжевую последовательность инициации репликации, в связи с чем они самостоятельно не способны реплицировать в дрожжах и размножаются только в интегрированном в геном дрожжей состоянии. Они содержат небольшие участки, гомологичные фрагментам хромосомной ДНК дрожжей. Интеграция происходит за счет гомологичной рекомбинации с частотой 10^{-5} . Эти плазмиды содержат также маркерные гены (например, ген биосинтеза лейцина LEU), которые обеспечивают селективный отбор в дрожжевых клетках. Основной недостаток в использовании интегративных векторов – это низкий уровень экспрессии (одна копия), поскольку плазмида наследуется как часть дрожжевого генома. Эту проблему решают встраиванием векторных последовательностей в область tandemных генов (гены рРНК), такая интеграция позволяет получить множество копий клонированных участков. Встраивание в такой вектор дрожжевой последовательности инициации репликации из дрожжевой хромосомы, называемой ARS (*autonomously replicating sequence*), позволило получить дрожжевые *репликативные* плазмиды. Такая плазмида может реплицироваться самостоятельно в клетках дрожжей без интеграции в хромосому. Проблема в том, что при делении почкованием плазмиды неравномерно распределяются по дочерним клеткам, часто потомки полностью лишены плазмид. Поэтому они не соответствуют для репродуктивной экспрессии.

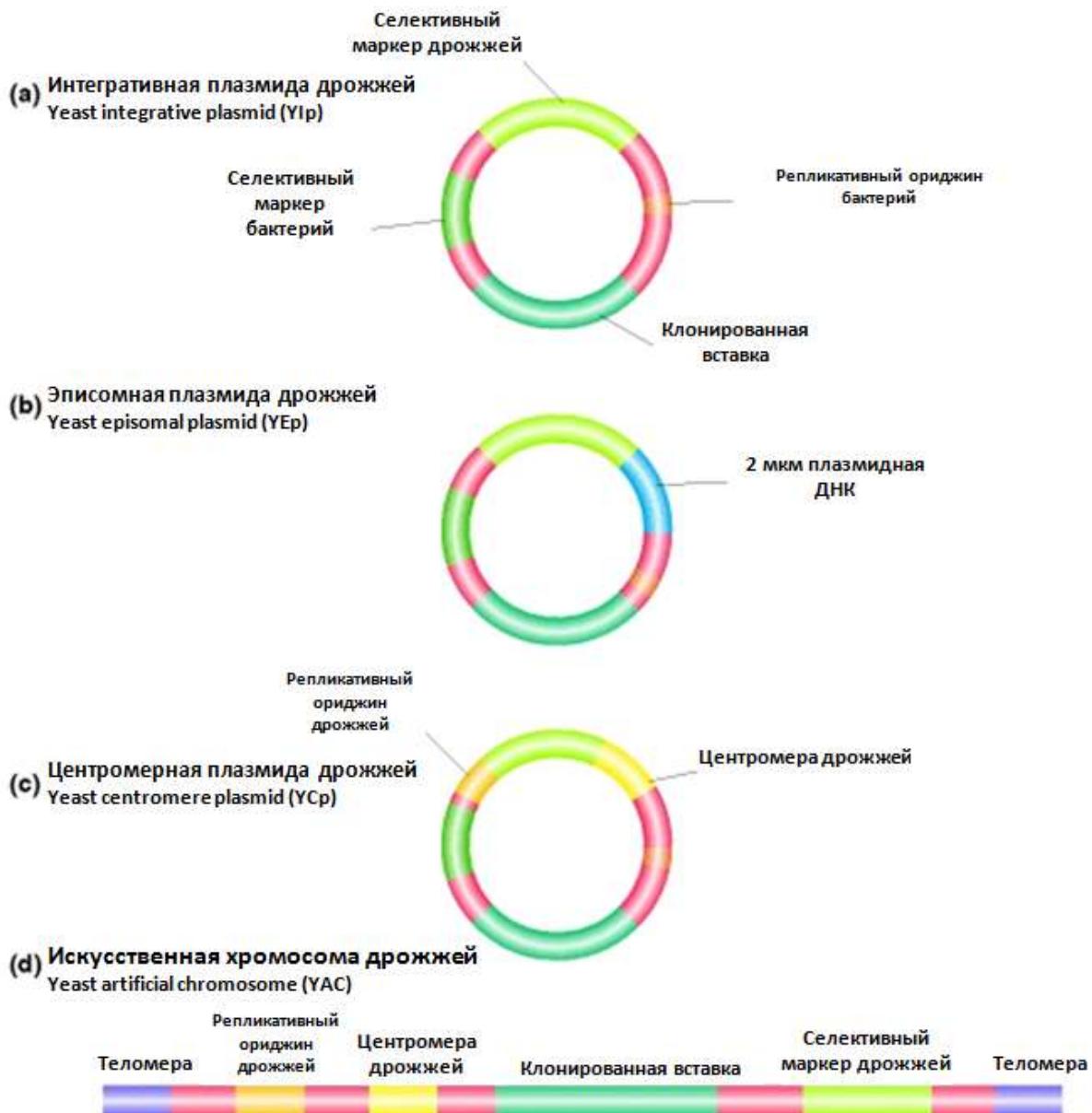


Рис. 20. Векторные системы дрожжей [Modern Genetic Analysis. Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, et al. New York: W. H. Freeman; 1999. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21428/]

Эпизомные плазмиды дрожжей (рис. 19b). Эпизома – это генетический элемент, который может существовать в свободном и интегрированном в хромосому состоянии, т.е. как плазмида, а также в виде части хромосомы. Именно такими свойствами обладают эпизомные плазмиды. Они созданы на основе дрожжевых 2μ -плазмид. Для получения дрожжевых эпизомных плазмид объединяют участок инициации репликации дрожжевой 2μ -плазмиды и интегративные плазмиды дрожжей. Полученные в результате объединения

эпизомные плазмиды являются многокопийными и позволяют получить от 30 до 50 копий на клетку. Эти плазмиды также неравномерно передаются дочерним клеткам, но стабильно поддерживаются за счет высокой копийности. Эпизомные плазмиды применяются для получения высокого уровня экспрессии гетерологичных генов и часто именно они используются для получения генно-инженерных продуктов дрожжей.

Центромерные плазмиды дрожжей получают из интегративных или эпизомных путем вставки в них последовательности дрожжевой центромеры (CEN-последовательности), (рис. 19c). Центромерная последовательность позволяет плазмидам правильно расходиться при митотическом делении, подобно хромосомам. Эти плазмиды очень стабильны, так как успешно распределяются между дочерними клетками. Их недостаток в хромосомноподобном поведении. Что обуславливает низкую копийность (1-3 копии на клетку). Экспрессию такой плазмиды можно повысить за счет оптимизации транскрипции и трансляции.

Искусственные дрожжевые хромосомы, YAC (Yeast artificial chromosome), предназначены для клонирования больших фрагментов генома (300 kb), (рис. 19d). Такой вектор содержит сайт инициации репликации дрожжевой хромосомы - ARS, сегмент центромерной области дрожжевой хромосомы – CEN, а также теломерные последовательности дрожжевой хромосомы – TEL-последовательности из повторяющихся олигонуклеотидов на концах линейных молекул ДНК, обеспечивающих стабильность вектора. YAC-системы стабильны, они были использованы при физическом картировании генома человека, при анализе больших транскриптов, при создании геномных библиотек. Важно, что встройка крупных фрагментов позволяет клонировать весь геном в виде относительно небольшого числа гибридных мини-хромосом, которые легко хранить и использовать в последующей работе.

При встраивании чужеродной ДНК в YAC-вектор может происходить нарушение рамки считывания маркерного гена, что используется при отборе.

Кроме того, некоторые YAC-векторы несут селективный маркер, независимый от сайта клонирования.

Двухгибридные системы дрожжей служат для идентификации белок-белковых взаимодействий (рис. 20). Это новая система дрожжей для выявления взаимодействия белков *in vivo*. Она основана на организации и функционировании регуляторного белка дрожжей GAL4, который является активатором транскрипции генов, кодирующих ферменты метаболизма галактозы. GAL4 состоит из двух доменов: N-концевого домена, который связывается со специфическими последовательностями ДНК, а также C-концевого домена, необходимого для активации транскрипции. Домены белка GAL4 активны при взаимодействии друг с другом.

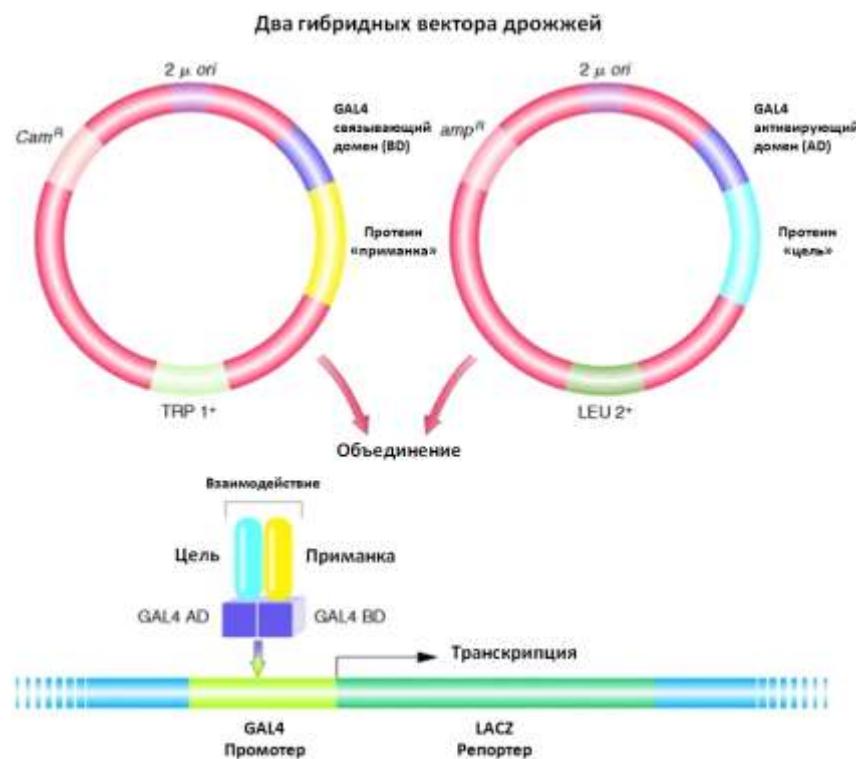


Рис. 20. Двухгибридная система дрожжей для идентификации генных взаимодействий. Тестирование использует связывание двух белков для восстановления функции GAL4-белка, который активирует репортерный ген. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21248/>

Когда домены входят в состав двух разных гибридных генов, они способны функционально активироваться *in vivo*, если сшитые с ними белки взаимодействуют друг с другом. Метод основан на использовании дву-

плазмидной системы в дрожжах, основа тестирования – активация биосинтеза галактозидазы. Ген одного из тестируемых белков (Bait-белок) сшивают с ДНК-фрагментом, соответствующим ДНК-связывающему домену GAL4 (BD-домен) на одной плазмиде, ген другого (Target-белок) – с фрагментом ДНК, кодирующим активаторный домен GAL4 (AD-домен), на другой плазмиде. Обе плазмиды котрансформируют в клетки дрожжей. Если в результате экспрессии фьюжен-конструкций тестируемые белки (Bait и Target) взаимодействуют, это приводит к физическому взаимодействию AD и BD доменов и активации синтеза галактозидазы, активации гена LACZ. При отсутствии взаимодействия, экспрессии GAL4 не происходит. Дрожжевая двухгибридная система нашла широкое применение для изучения взаимодействия белков различных организмов и вирусов.

Рекомбинантные белки, синтезированные в *S. cerevisiae*, применяются в качестве вакцин, фармацевтических препаратов и для диагностики. Так, для формирования иммунитета используют генно-инженерную вакцину против вируса гепатита В, созданную на основе антигена вируса – белка оболочки. Для диагностики используют белок вируса гепатита С, а также антигены HIV-1. В качестве лекарственных средств используют инсулин, фактор роста, фактор XIIIа системы свертывания крови и др. При использовании эпизомного вектора дрожжей с дрожжевой сигнальной последовательностью получен белок гирудин, кодируемый медицинской пиявкой *Hirudo medicinalis*. Белок – мощный антикоагулянт крови и не вызывает иммунологических реакций у человека, способен разрушать сгустки венозной крови и устранять проявления тромбоза. На эпизомном векторе клонирован ген человека супероксид-дисмутаза, который катализирует связывание супероксид-аниона с образованием перекиси водорода, предотвращая повреждение клеток. Препарат активно используется при хирургических вмешательствах, лечении остеоартрита, ревматоидного артрита, склеродермии и др. Однако, при работе с рекомбинантными дрожжами обнаружились проблемы. Прежде всего уровень экспрессии дрожжевых систем низкий и уступает бактериальным системам экспрессии. При масштабировании

плазмиды теряются, а рекомбинантные белки часто гипергликозилированы, что влияет на иммуногенность. Кроме того, в некоторых системах секретируемые белки концентрируются в периплазме, что усложняет очистку. В практике используются и другие дрожжевые системы экспрессии. Например, метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* в качестве организма-хозяина, которые без больших затрат можно выращивать в промышленных биореакторах. С использованием интегративного вектора в этих дрожжах получают поверхностный антиген вируса гепатита В. На их основе был осуществлен синтез бычьего лизоцима С2. Это желудочный фермент, разрушающий клеточные стенки бактерий, он устойчив к пртеазам и сохраняет активность в узком диапазоне рН, что позволяет использовать его в качестве добавки к кормам жвачных животных для улучшения пищеварения. В результате при ферментации 10 л культуры *P. Pastoris* в течении 200 ч в непрерывном режиме при высокой плотности клеток синтезировалось примерно 20 г лизоцима С2. Аутентичные гетерологичные белки были получены и с помощью других дрожжевых систем. Например, гемоглобин А человека с правильной тетрамерной структурой альфа- и бета-цепей, а также человеческая урокиназа получены в дрожжах *H. polymorpha* и *S. cerevisiae*. Таким образом, дрожжевые системы экспрессии играют важную роль в получении гетерологичных белков для промышленных и медицинских целей.

Генетическая инженерия бактерий

Развитие технологий геномного секвенирования, биоинформационного анализа и создания рекомбинантных ДНК, а также знания о генетике, физиологии и биохимии бактерий являются мощной базой для практического применения рекомбинантных микроорганизмов в практических целях.

ДНК-диагностика - это один из наиболее современных высокотехнологичных методов исследования. Информация о любом организме заключена в его геноме. Патогенность бактерий определяется наличием в геноме специфических генов. Последовательности нуклеотидов этих генов могут служить в качестве диагностических зондов. В основе такой диагностики

лежит ДНК-гибридизация. ДНК-мишень фиксируют на мембране, затем на мембрану наносят меченный ДНК-зонд, проводят гибридизацию и выявляют гибридные молекулы путем идентификации метки. В качестве ДНК-мишени используют образцы крови, мочи, кала, смыв с зева без предварительной очистки. Гибридизационный зонд должен быть высокоспецичен. Для его получения используют ДНК патогенов, которую предварительно расщепляют рестриктазами, а затем фрагменты рестрикции клонируют в плазмидах. Проводят скрининг рекомбинантных ДНК с применением патогенных и непатогенных штаммов. Те, что гибридизуются с ДНК патогенов и не гибридизуются с непатогенной ДНК служат видоспецифичными зондами. Получены ДНК-зонды ко многим патогенам, бактериям и вирусам. Сегодня с их помощью можно диагностировать Спид, гепатиты, малярию, сальмонелез, гастроэнтериты и др.

ДНК-анализы широко применяются в диагностике инфекционных заболеваний, позволяя обнаруживать даже единичные микроорганизмы в организме человека. ДНК-диагностика объединяет несколько методов исследования, но самый распространенный сегодня - метод ПЦР. На рынке появляется все больше тест-систем, предназначенных для выявления возбудителей различных заболеваний, мутаций генов человека, животных и растений. ПЦР-анализ становится все более востребованным, поскольку расшифрованы нуклеотидной последовательности геномов ряда патогенных и условно патогенных микроорганизмов и выделены специфические последовательности патогенов. В последние годы появилось большое количество модификаций ПЦР, позволивших значительно увеличить потенциальные возможности первоначально предложенного метода: мультипраймерная ПЦР, гнездовая ПЦР, ПЦР *in situ*, ПЦР в режиме реального времени и др. При использовании метода ПЦР для идентификации РНК, а не ДНК применяется модифицированный ОТ-ПЦР метод.

ДНК-диагностика - это быстро развивающееся направление. Использование ПЦР и специфических зондов существенно повышает чувствительность тестов

и позволяет применять нерадиоактивные хромогенные, хемилюминесцентные и флуоресцентные системы регистрации. Во многих случаях для выявления мутации или экзогенной ДНК инфекционного агента в исследуемом образце достаточно провести ПЦР с последующим электрофоретическим разделением продуктов. С помощью ДНК-диагностики можно будет выявлять наиболее распространенные генетические и инфекционные заболевания, а также новообразования.

Лекарственные средства. До появления технологии рекомбинантных ДНК лекарственные препараты на основе белков человека получали в небольших количествах, и их производство обходилось очень дорого. С помощью новой геномной технологии препараты получают в количествах, достаточных для тестирования и применения в клинике. В настоящее время на основе кДНК различных белков человека получают лекарственные препараты для лечения различных заболеваний человека. Ежегодный объем мирового рынка лекарственных препаратов на основе белков человека составляет около 150 млрд. долларов и постоянно растет.

Инсулин. Для получения кДНК генов целевых белков и клонирования их в векторные системы применяют несколько экспериментальных подходов. Во-первых, это использование тканей, насыщенных искомым белком. Примером такого подхода служит получение рекомбинантного человеческого инсулина. Впервые кДНК была получена на основе мРНК из клеток ткани поджелудочной железы, из которых выделяли суммарную мРНК, в составе которой доминировала мРНК инсулина, т.е. основным белком, синтезируемым клетками поджелудочной железы, является инсулин, и 70% мРНК, выделенных из этих клеток, кодируют именно его. На основе мРНК получали кДНК инсулина, клонирование которой в бактериальный вектор позволило разработать биотехнологию получения инсулина на основе рекомбинантных бактерий *E.coli*.

Интерфероны. Такой подход был неприменим для белков, количество которых в клетках чрезвычайно мало и место синтеза точно неизвестно. В этом

случае использовалась техника обогащения: ее впервые применили при получении альфа, бета- и гамма-интерферонов (ИФ) человека, имеющих важную терапевтическую значимость. Выделение кДНК интерферонов проводили из лейкоцитов человека. Сначала получали мРНК из лейкоцитарных клеток. Далее мРНК фракционировали по размерам и проводили и обратную транскрипцию. Полученные кДНК клонировали на плазмидах pBR322 в *E.coli*. Клоны делили на группы, которые тестировали путем гибридизации с неочищенным препаратом ИФ-мРНК. Из образовавшихся гибридов, содержащих клонированную ДНК и мРНК, выделяли мРНК и проводили ее трансляцию в бесклеточной системе синтеза белка. Определяли интерфероновую противовирусную активность каждой смеси, полученной в результате трансляции. Группы, проявлявшие активность вновь тестировали и повторяли до тех пор, пока не идентифицировали клон, содержащий полноразмерную ИФ-кДНК человека. Так получили гены нескольких типов интерферонов, которые легли в основу разработки биотехнологии получения ИФ-альфа, ИФ-бета и ИФ-гамма.

ИФ-альфа и ИФ-бета синтезируются клетками, обработанными препаратами вирусов или вирусной РНК, а ИФ-гамма вырабатывается в ответ на действие веществ, стимулирующих рост клеток. ИФ-альфа кодируется семейством генов, включающим как минимум 15 неаллельных генов, в то время как ИФ-бета и ИФ-гамма кодируются одним геном каждый. Подтипы ИФ-альфа проявляют разную специфичность. Например, при проверке эффективности ИФ-альфа-1 и ИФ-альфа-2 на обработанной вирусом линии клеток быка эти интерфероны проявляют сходную противовирусную активность, в случае же обработанных вирусом клеток человека ИФ-альфа-2 оказывается в семь раз активнее, чем ИФ-альфа-1. Если противовирусная активность проверяется на клетках мыши, то ИФ-альфа-2 оказывается в 30 раз менее эффективным, чем ИФ-альфа-1. В связи с тем, что ИФ различаются по уровню и специфичности противовирусной активности были предприняты попытки создать ИФ с комбинированными свойствами комбинацией фрагментов генов разных ИФ. Ожидалось

образование гибридных ИФ-белков с другими свойствами, чем у каждого из исходных белков. Сравнение последовательностей кДНК ИФ-альфа-1 и ИФ-альфа-2, показало, что они содержат одинаковые сайты рестрикций в позициях 60, 92 и 150. После расщепления обеих кДНК в этих сайтах и последующего лигирования фрагментов было получено несколько гибридных генов. Эти гены экспрессировали в *E.coli*, синтезированные белки очистили и исследовали их биологические функции. Проверка защитных свойств гибридных ИФ на культуре клеток млекопитающих показала, что некоторые из них проявляют большую активность, чем родительские молекулы. Кроме того, многие гибридные ИФ индуцировали образование 2'-5'-олигоизоаденилат-синтетазы в контрольных клетках. Этот фермент участвует в синтезе 2'-5'-связанных олигонуклеотидов, которые в свою очередь активируют латентную клеточную эндорибонуклеазу, расщепляющую вирусную мРНК. Другие гибридные ИФ проявляли большую, чем родительские молекулы, антитролиферативную активность в культурах различных раковых клеток человека.

Гормон роста. Стратегию конструирования новых белков путем замены функциональных доменов или с помощью направленного мутагенеза можно использовать для усиления или ослабления биологического свойства белка. Например, нативный гормон роста человека (ГРЧ) связывается в разных типах клеток как с рецептором гормона роста, так и с пролактиновым рецептором. Чтобы избежать нежелательных побочных эффектов в процессе лечения, нужно исключить присоединение ГРЧ к пролактиновому рецептору. Поскольку участок молекулы гормона роста, связывающийся с этим рецептором, по своей аминокислотной последовательности лишь частично совпадает с участком молекулы, который взаимодействует с пролактиновым рецептором, удалось избирательно снизить связывание гормона с последним. Для этого использовали сайт-специфический мутагенез, в результате которого произошли определенные изменения в боковых группах некоторых аминокислот (His-18, His-21 и Glu-174) — лигандов для ионов Zn²⁺, необходимых для высокоаффинного связывания ГРЧ с пролактиновым рецептором.

Модифицированный гормон роста связывается только со «своим» рецептором. Полученные результаты представляют несомненный интерес, но смогут ли модифицированные ГРЧ найти применение в клинике, пока неясно.

Терапия муковисцидоза. Неизлечимым наследственным заболеванием человека является муковисцидоз. Такие пациенты страдают инфекционными заболеваниями, поражающими легкие. Лечение рецидивирующих инфекций антибиотиками приводит к появлению резистентных штаммов патогенных бактерий. Бактерии и продукты их лизиса вызывают накопление в легких вязкой слизи, затрудняющей дыхание. Одним из компонентов слизи является высокомолекулярная ДНК, которая высвобождается из бактериальных клеток при лизисе. Ученые выделили и экспрессировали ген ДНКазы — фермента, который расщепляет высокомолекулярную ДНК на более короткие фрагменты. Очищенный фермент вводят в составе аэрозоля в легкие больных муковисцидозом, он расщепляет ДНК, вязкость слизи снижается, что облегчает дыхание и улучшает состояние больного.

Другой препарат, помогающий таким больным — альгинат-лиаза. Альгинат — это полисахарид, синтезируемый бактериями. Его мономерами являются бета-D-маннуронат и альфа-1-гулуронат, относительное содержание и распределение которых определяют свойства альгината. Так, остатки а-L-гулуроната образуют межцепочечные и внутрицепочечные сшивки путем связывания ионов кальция; остатки бета-D-маннуроната связывают ионы других металлов. Альгинат, содержащий такие сшивки, образует эластичный гель, вязкость которого пропорциональна размеру полисахаридных молекул. Выделение альгината слизистыми штаммами *Pseudomonas aeruginosa* существенно повышает вязкость слизи у больных муковисцидозом. Чтобы очистить дыхательные пути и облегчить состояние больных, в дополнение к обработке ДНКазой следует провести деполимеризацию альгината с помощью альгинат-лиазы. Ген альгинат-лиазы был выделен из *Flavobacterium* sp., грамотрицательной почвенной бактерии, активно вырабатывающей этот фермент. На основе *E.coli* был создан банк клонов *Flavobacterium* и проведен

скрининг тех из них, которые синтезируют альгинат-лиазу, расщепляющую альгинат бактерий. Для получения фермента соответствующий ген клонировали в плазмидный вектор бацилл с сигнальным пептидом альфа-амилазы *B.subtilis*. Рекомбинантные клетки выделяли альгинат-лиазу в культуральную жидкость. Тестирование показало, что фермент способен эффективно разжижать альгинаты, синтезируемые слизистыми штаммами *P.aeruginosa*, которые были выделены из легких больных муковисцидозом.

Производство антител. Молекула антитела, иммуноглобулин, состоит из: двух «легких» (L) и двух «тяжелых» (H) белковых цепей, которые соединены водородными связями и дисульфидными мостиками (рис. 21).

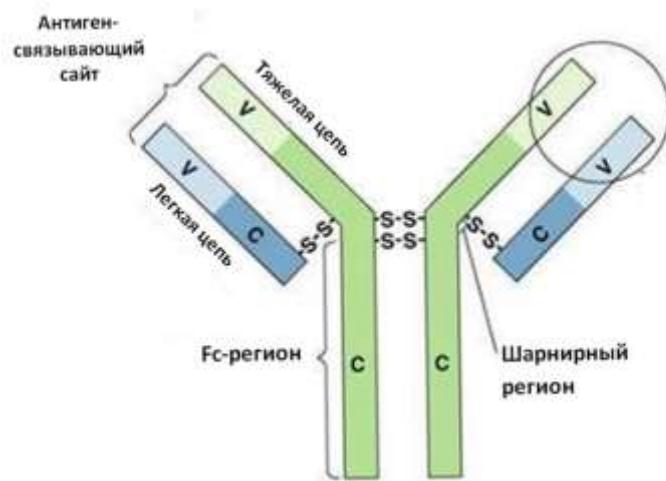


Рис. 21. Структура иммуноглобулина (<http://en.goldenmap.com/Antibody/>).

Обе цепи иммуноглобулина, H и L, содержат вариабельные (VH и VL) области на N-концах, причем, N концевые участки обеих L- и H-цепей образуют антигенсвязывающую область антитела, для которой характерна очень высокая изменчивость последовательности аминокислот. Помимо вариабельных (VH и VL), каждая L-цепь содержит одну константную область, или домен (CL), а каждая H-цепь — три константных области, или домена (CH1, CH2 и CH3). При обработке антитела протеолитическим ферментом папаином образуются три фрагмента: два идентичных (Fab), каждый из которых содержит L-цепь, связанную дисульфидным мостиком с VH- и CH1-доменами H-цепи, и один Fc, состоящий из двух соединенных дисульфидной

связью CH2- и CH3-доменов Н-цепи. Fab-фрагмент, точнее его N-концевая часть, называемая Fv-фрагментом; обладает антигенсвязывающей активностью, специфичной для молекулы антитела.

Для использования антител в диагностике или терапии в качестве инструмента доставки лекарственных средств в участок локального функционирования (например, при тромбоэмболии мозговых и сердечных артерий) достаточно антигенсвязывающей области антител (Fv-фрагмента). Для производства рекомбинантных антител использовали бактерии *E.coli*. На мРНК лимфоцитов синтезировали кДНК, кодирующую Н- и L-цепи антител. Проводили расщепление кДНК рестриктазами, в результате которого образуется множество генных сегментов, кодирующих Н- и L-цепи антител. Сегменты клонировали в ДНК фага лямбда и получили фаговую библиотеку. Затем проводили объединение клонированных сегментов ДНК, кодирующих фрагменты Н- и L-цепей антител в одном плазмидном векторе. Скрининг библиотеки объединенных клонов осуществляли по антигенсвязывающей активности – оценивали полноценность Fv-области. Плазмиду с полноценной Fv-областью трансформировали в бактерии *E.coli*. Получали продукт, который используют в диагностике и терапии. Лекарственные вещества можно присоединить к Fv-фрагментам, например, специфичным в отношении опухолевых клеток. В перспективе разрабатывается получение комплекса белков, специфично связывающегося с ВИЧ-инфицированными клетками.

Антибиотики. Продукция антибиотиков микроорганизмами (грибы, актиномицеты и бактерии) является сложным процессом и определяется итоговой экспрессией генами биосинтеза и секреции в среду самого продукта, а также генами, отвечающими за антибиотикоустойчивость бактерий к этому продукту. Поэтому изменения отдельного гена в итоге не приводят к повышению выхода продукта. Высокую продуктивность, как правило, проявляют штаммы, устойчивые к действию высоких концентраций антибиотиков в культурной жидкости. Это свойство необходимо учитывать при конструировании суперпродуцентов. Большой эффект здесь дает технология

рекомбинантных ДНК. С ее помощью можно создавать новые антибиотики с уникальной структурой, оказывающие более мощное воздействие на определенные микроорганизмы и обладающие минимальными побочными эффектами. Также генно-инженерные подходы могут использоваться для увеличения выхода антибиотиков и соответственно для снижения стоимости их производства.

Биосинтеза антибиотика может включать от 10 до 30 стадий, так что поиск в геноме и клонирование всех генов биосинтеза – это сложная задача. Воссоздать полный кластер генов биосинтеза антибиотика можно путем сравнительного наложения геномов бактерий дикого типа, производящих этот продукт с геномом мутантных штаммов, полностью утративших эту способность. С помощью генетических или биохимических экспериментов можно идентифицировать, а затем выделить один или несколько ключевых ферментов биосинтеза, определить их N-концевые аминокислотные последовательности и, исходя из этих данных, синтезировать олигонуклеотидные зонды. Манипулируя генами одного пути биосинтеза можно добиться увеличения выхода конечного продукта. Этот подход использовался для выделения из *Penicillium chrysogenum* гена синтетазы изопенициллина N, которая катализирует окислительную конденсацию 5-аминоадипил-цистеинил-Р-валина в изопенициллин N, ключевое промежуточное звено в биосинтезе пенициллинов, цефалоспоринов и цефамицинов.

Новые антибиотики с уникальными свойствами и специфичностью можно получить, проводя генно-инженерные манипуляции с генами, участвующими в биосинтезе уже известных антибиотиков. При объединении в одном микроорганизме различных путей биосинтеза добиваются, чтобы промежуточный продукт одного пути биосинтеза служил субстратом для фермента другого пути биосинтеза. В одном из первых экспериментов был получен новый антибиотик путем объединении в одном микроорганизме двух различающихся путей биосинтеза. Эти данные показали, что когда будут детально изучены различные пути биосинтеза антибиотиков, появится

возможность создавать новые уникальные высокоспецифичные антибиотики, манипулируя генами, которые кодируют соответствующие ферменты.

Вакцины. Технология рекомбинантных ДНК позволяет создавать новое поколение вакцин. Введение вакцины вызывает формирование антител, которые при последующей инфекции патогеном приводят к его инактивации, блокируют пролиферацию и не позволяют развитие заболевания.

Аттенуированные вакцины. Современные вакцины создают на основе инактивированных патогенных микроорганизмов, либо живых, но невирулентных (аттенуированных) штаммов. Патогенные микроорганизмы модифицируют путем удаления из генома генов, ответственных за вирулентность, при этом способность вызывать иммунный ответ сохраняется. Примером такой вакцины служит противохолерная вакцина, созданная на основе штаммов *Vibrio cholerae*, из хромосомной ДНК которых удален ген энтеротоксина. Такие модифицированные микроорганизмы используют в качестве живой вакцины. Другой способ получения вакцин заключается в том, что из хромосомной ДНК патогена удаляют гены, кодирующие жизненно важные функции, например, гены *rig*, кодирующие ферменты биосинтеза пуринов, либо гены *aro*, ответственные за биосинтез ароматических соединений. Такие штаммы не способны пролиферировать, вызывают легкую форму инфекции и стойкий иммунитет. Таким путем была создана вакцина против сальмонеллеза на основе бактерий рода *Salmonella*.

Пептидные (субъединичные) вакцины. Для выработки в организме-хозяине антител в ответ на инфекцию достаточно присутствие только очищенных поверхностных белков. Такие вакцины содержат фрагмент патогенного организма, для их разработки также используют технологию рекомбинантных ДНК. Достоинства таких вакцин в безопасности, в ней отсутствуют дополнительные и нуклеиновые кислоты, которые могут оказать нежелательные побочные эффекты. Однако очистка специфического белка, способного вызывать иммунитет, стоит дорого, а конформация конечного продукта очистки может отличаться от исходной и приводить к изменению его

антигенных свойств. Субъединичные вакцины разрабатываются на основе вирусов гриппа А и В, вирусов гепатита А и В, вируса бешенства, вируса герпеса, вируса геморрагической лихорадки, микобактерий, сальмонелл, нессерий, шигелл, холерного вибриона и др. Примером может служить пептидная вакцина к вирусу гепатита В. Она создана на фрагменте белка внешней оболочки вируса размером до 200. Оказалось, что пептид обладает такой же иммуногенностью как интактный вирус гепатита В и может быть использован для формирования иммунного ответа. Ген, кодирующий оболочечный белок вируса, встраивают в вектор экспрессии и получают высокоуровневую продукцию белка, который используют как вакцину. Другой пример с противотуберкулезной вакциной БЦЖ (Бацилла Кальметта—Герена или *Bacillus Calmette—Guérin*, BCG). Вакцины на основе живых ослабленных форм, способны вызвать заболевание у людей со слабым иммунитетом, например у больных СПИДом. Микобактерии секрецируют в среду около ста белков. Шесть из них являются доминирующими, а их комбинация дает устойчивый иммунитет. На этой основе разработали безопасную и эффективную вакцину для профилактики туберкулеза у человека. Гены соответствующих белков микобактерий туберкулеза клонированы в вектора экспрессии, которые трансформированы в бактерии *E.coli*, продукты экспрессии используются в качестве вакцины.

В настоящее время интенсивно разрабатываются вакцины из **плазмидных ДНК**, кодирующих антигены возбудителей инфекционных заболеваний. Идея таких вакцин состоит в том, чтобы встроить гены микроорганизма, ответственные за синтез микробного белка, в геном хозяина. При этом клетки организма-хозяина начинают продукцию чужеродного для них белка, а иммунная система вырабатывает антитела к нему. Эти антитела и будут нейтрализовать возбудителя в случае попадания его в организм. Плазмиду, несущую ген белка-антигена вводят внутримышечно животным. В 75% случаев плазмида включалась в клетки мыши и синтезировались антитела к белку антигену. В опытах на животных было показано, что таким путем можно

выработать не только антитела (гуморальный иммунитет), но и специфический цитотоксичный ответ (клеточный иммунитет), который ранее считался достижимым только с помощью живых вакцин. ДНК-вакцины могут быть получены в большом количестве, они стабильны и лишены инфекционности. Перспективным направлением является разработка многокомпонентных вакцин, содержащих две или несколько плазмидных форм, которые кодируют разные антигены, цитокины или другие биологически активные молекулы. К настоящему времени на животных изучено более 40 вирусных, бактериальный, грибковых и паразитарных возбудителей вакцин (в том числе против вируса СПИД, гриппа, бешенства, лимфоцитарного хориоменингита, гепатитов В и С, простого герпеса, папилломы, а также возбудителей малярии, лейшманиоза, туберкулёза). Однако, в опытах на добровольцах до сих пор удовлетворительного иммунного ответа получено не было. Также, при использовании ДНК-вакцин существует несколько неясных моментов: неизвестны сроки, в течение которых клетки организма будут вырабатывать антигенный белок далеко не все ясно с безопасностью ДНК-вакцин: необходимо исключить онкогенную опасность. Еще недостаточно изучено, может ли вводимая ДНК встраиваться в геном клетки человека и вызывать риск развития рака. Образование антигена в организме может продолжаться длительное время (до нескольких месяцев), это может привести к развитию различных форм иммуносупрессии и других патологических явлений. Чужеродная ДНК может вызвать образование анти-ДНК-антител, которые способны индуцировать различные формы аутоагрессии и иммунопатологии. Сам образующийся антиген может обладать побочным биологическим действием.

Растительные вакцины. Революционным направлением является разработка вакцин на основе трансгенных растений, в геном которых был встроен соответствующий фрагмент генома патогенного микроорганизма. Данные свидетельствуют о безусловной перспективе в разработке и практическом использовании таких вакцин. Такой способ иммунизации

является безопасным и доступным. Немаловажное значение имеет высокая экономичность растительных вакцин с учетом, что по прогнозам многих специалистов стоимость существующих генно-инженерных вакцин будет возрастать, а цена многих вновь разрабатываемых вакцин будет выше стоимости применяемых в практике вакцин.

Первая растительная вакцина получена в 1992 году: трансгенное растение табака стало продуцировать антиген, введение которого мышам, вызывало мощный иммунный. В 1998 году с помощью картофеля, продуцирующего В-субъединицу холерного анатоксина, была получена выраженная защита у поедавших его мышей при заражении их холерой. Аналогичная вакцина против кори была получена на табаке. В том же 1998 году 10 из 11 добровольцев, получивших по 100 гр сырого картофеля, продуцирующего антигены энтеропатогенной кишечной палочки, начали вырабатывать в слизистой кишечника антитела к этому возбудителю. Сейчас испытываются "картофельные" вакцины к вирусу -возбудителю диареи и гепатиту В с обнадеживающими результатами. На животных испытываются вакцины против бешенства, выращенные на помидорах. Существуют опасения в отношении "съедобных вакцин": в отношении иммунного ответа, сохранности антигена в кислой среде желудка, способности к хранению, оптимальном дозировании.

Векторные вакцины получают путем встраивания в геном безопасного авирулентного вируса ген(ы), кодирующие антигенные детерминанты патогена. Модифицированный вирус используют как живую вирусную вакцину. Клетки, в которых векторный вирус реплицируется *in vivo*, экспрессируют чужеродный белок, вызывающий иммунный ответ на данный белок. Вирус оспы был одним из первых вирусов, на примере которого была показана возможность такой замены без потери жизнеспособности рекомбинантного вируса с экспрессией белка, кодируемого чужеродным геном и индукцией иммунитета на этот белок. Подход к получению безопасной эффективной живой вакцины заключается в использовании стабильного вирусного штамма для создания рекомбинантов, которые экспрессируют антигены других вирусов, против которых

формируется иммунитет. Члены семейства вирусов оспы оказались удобными для получения рекомбинантных гибридов, благодаря их большому геному, позволяющему удалять значительные участки ДНК без потери способности к репликации. Использование этого вируса в качестве вектора для вакцинации имеет ряд преимуществ: способность размножаться в клетках многих видов животных, экспрессировать несколько генов, индуцировать гуморальный и опосредованный клетками иммунитет, термостабильность, экономичность производства и легкость применения. Гены, кодирующие различные антигены многих вирусов, были включены в геном вируса осповакцины. Прививка животных этими рекомбинантными векторными вакцинами сопровождалась хорошим иммунным ответом. Например, вирус осповакцины, использованный в качестве вектора вакцины против бешенства, будучи включенным в приманку для скармливания, защищал лис и хорьков от бешенства. Возможность включения нескольких генов, кодирующих соответствующие иммуногены, позволяет создать новый тип комбинированных (поливалентных) вакцин.

Потенциальными векторами являются многие ДНК-содержащие вирусы: могут быть использованы адено-, бакуло- и герпесвирусы. Они, как и вирусы оспы, имеют крупный геном, - по крайней мере с одной несущественной областью для репликации и несколькими участками, в которые могут быть встроены чужеродные гены и экспрессированы без потери инфекционности. В качестве векторов успешно используют вирусы оспы птиц. Основное различие векторных вакцин с живыми вакцинами заключается в том, что экспрессируется только один или несколько селективных генов, реплицируемых вместе с геном вектора. В этом отношении, векторные вакцины схожи с субъединичными вакцинами, но отличаются от них тем, что являются «реплицирующимися антигенами». Рекомбинантные векторные вакцины сочетают в себе положительные качества и живых и инактивированных вакцин. При репликации в организме рекомбинантного вируса с встроенным чужеродным геном, кодирующим синтез гликопroteина, который может быть экспрессирован на поверхности клеток и может

индуцировать развитие как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Субъединичные вакцины могут индуцировать развитие только гуморального иммунного ответа.

Использование генно-инженерных вакцин - новое перспективное направление в генной инженерии. В последнее время этот метод получил широкое применение в разработке нового поколения вакцин против различных вирусных заболеваний. Естественно, что становление принципиально нового направления создания вакцин сопряжено со многими трудностями. Однако на главный и принципиальный вопрос - способны ли рекомбинантные вакцины вызывать выраженный и длительный иммунитет - получен положительный ответ. Накопилось также много данных о получении рекомбинантных вакцин, особенно на основе вируса осповакцины, содержащих гены различных вирусов, об их антигенной и иммуногенной активности при испытании в лабораторных и практических условиях.

Получение бактериальных рестриктаз. Выделено более трех тысяч рестриктаз. Более шестисот рестриктаз доступны в виде коммерческих препаратов и повседневно используются в лабораториях для модификации ДНК и решения широкого ряда генно-инженерных задач. Рестриктазы с различными сайтами узнавания являются основным инструментом генетических исследований в генной инженерии и молекулярной биологии. Эти ферменты синтезируются разными микроорганизмами. Для получения рестриктаз их гены клонируют по универсальной методике:

1. ДНК бактерий расщепляют рестриктазой HindIII
2. Полученные фрагменты ДНК клонируют в плазмиде pBR322 после ее обработке рестриктазой HindIII
3. Рекомбинантные плазмиды трансформируют в клетки бактерий *E. coli* и инфицируют фагом лямбда
4. Если клетки устойчивы к действию фага, то в клетках содержится рестриктаза. Такие клетки лизируют и в лизатах определяют активность
5. Положительные рекомбинантные клоны используют для получения белка.

Именно этот подход использован для выделения генов различных бактериальных рестриктаз, имеющих в настоящее время коммерческую значимость.

Получение витамина С. На основе генно-инженерных методов можно получать микроорганизмы с новыми свойствами, например, с новой ферментативной активностью. В настоящее время для производства витаминов используют трудоемкие химические методы. Например, для получения витамина С используют несколько химических и одну микробиологическую стадию. Исходным сырьем является D-глюкоза, из которой в ряду реакций на последней стадии получают 2-кето-L-гулоновую кислоту (2-KLG), которая в кислых условиях превращается в L-аскорбиновую кислоту. Исследования метаболизма различных микроорганизмов показали, что 2-кето-L-гулоновую кислоту можно получить микробиологическим путем. Бактерии *Acetobacter*, *Gluconobacter* и *Erwinia* способны превращать D-глюкозу в 2,5-дикето-D-глюконовую кислоту (2,5-DKG), другие микроорганизмы *Corynebacterium*, *Brevibacterium* и *Arthrobacter* синтезируют редуктазу, которая способна преобразовывать 2,5-дикето-D-глюконовую кислоту в 2-кето-L-гулоновую кислоту. Эти исследования показали, что если в одном микроорганизме объединить оба метаболических пути, то такие микроорганизмы будут способны превращать D-глюкозу в 2-кето-L-гулоновую кислоту. Совместное выращивание этих микроорганизмов невозможно в силу различий условий культивирования и свойств, что привело бы к спонтанному выводу из среды одного из них. Поэтому ген фермента 2,5-DKG редуктазы неспорулирующих почвенных бактерий *Corynebacterium* необходимо трансформировать в клетки *Erwinia*. Ген редуктазы *Corynebacterium* был клонирован в *E. coli*, а затем переклонирован в *Erwinia herbicola*. Рекомбинантные клетки *Erwinia herbicola* были способны к образованию из D-глюкозы непосредственно 2-кето-L-гулоновую кислоту. Так с помощью техники рекомбинантных ДНК удалось объединить метаболические реакции разных микроорганизмов. Рекомбинантные бактерии способны были синтезировать конечный продукт

комбинированного метаболического пути и обрели коммерческую значимость. Выход конечного продукта можно увеличить повышением термостабильности и специфической активности рекомбинантной редуктазы.

Схемы путей получения витамина С.

Химический путь получения витамина С:

D-глюкоза---химические превращения---2-KLG ---понижение pH---L-аскорбиновая кислота

Микробиологический путь получения витамина С:

1. D-глюкоза---2,5-DKG (синтезируют микроорганизмы *Erwinia*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*)

2. 2,5-DKG---2-KLG (синтезируют микроорганизмы *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*)

Генно-инженерная технология для получения витамина С:

D-глюкоза---2,5-DKG---2-KLG рекомбинантный штамм *Erwinia herbicola* с геном 2,5-DKG редуктазы *Corynebacterium*

Получение аминокислот. Потребность в аминокислотах во всех сферах деятельности людей крайне велика. В промышленном масштабе их получают экстракцией белковых гидролизатов, а также как продукты метаболизма двух неспорулирующих грамположительных почвенных бактерий *Corynebacterium* и *Brevibacterium*. Для увеличения продуктивности микроорганизмов используют генно-инженерный подход. Он заключается в изменении специфичности продуктов генов, участвующих в ключевых реакциях биосинтеза аминокислот. Ферменты биосинтеза аминокислот ингибируются конечным продуктом. Модификация соответствующих генов в направлении приобретения устойчивости к ингибиции конечным продуктом (ингибиция по типу обратной связи) может привести к увеличению выхода конечного продукта. Большинство плазмидных векторов реплицируются в грамотрицательных бактериях, поэтому для реализации этой задачи необходимо создать векторы, предназначенные для экспрессии в *Corynebacterium* и *Brevibacterium*. На этом пути получены положительные результаты в увеличении выхода триптофана

Corynebacterium glutamicum. При трансформации штамма-продуцента вектором, содержащим ген, кодирующим один из ферментов синтеза триптофана (антранилатсинтазу) выход триптофана увеличился в 2.5 раза за счет дополнительных копий гена фермента синтеза. Еще более высокий уровень синтеза триптофана достигался при введении в клетки *C. glutamicum* генов трех ключевых модифицированных ферментов синтеза триптофана. В гены соответствующих белков были введены мутации, которые обеспечивали нечувствительность к ингибиованию конечным продуктом.

Биодеградация токсических соединений. Проблема утилизации токсических отходов стоит очень остро. Основную группу почвенных микроорганизмов, разрушающих ксенобиотики, составляют бактерии рода *Pseudomonas*. Разные штаммы способны расщеплять более 100 органических соединений. Гены, кодирующие ферменты биодеградации, могут иметь хромосомную и плазмидную локализацию, но чаще входят в состав крупных плазмид. Как правило, одна плазмида содержит гены ферментов только одного пути расщепления. В основе создания новых рекомбинантных штаммов заложены два принципа. Во-первых, объединяя плазмиды разных штаммов в одном хозяине, можно получить организм, способных к расщеплению нескольких соединений. Во-вторых, создание новых штаммов может основываться на манипуляции с генами одного или нескольких путей расщепления. Первый подход был реализован для получения штамма с широкими катаболическими возможностями. Вторая стратегия направлена на усовершенствование пути расщепления ксенобиотиков. Ферменты метаболического пути модифицируются по пути устойчивости к ингибиованию конечным продуктом.

Микробные инсектициды. Огромный ущерб урожаю могут наносить насекомые. Для борьбы с ними получают все большее признание природные микробные инсектициды, т.к. не оказывают вредного воздействия на человека и быстро разрушаются в окружающей среде. Для увеличения эффективности микробных инсектицидов можно проводить манипуляции с их генами, и в

частности, с генами инсектицидов спорообразующих почвенных бактерий *B.thuringiensis* или бакуловирусов насекомых. Эти инсектициды безопасны, высоко специфичны и эффективны. Наиболее изученными и часто используемыми инсектицидами являются бактерии *B.thuringiensis*. Они представлены множеством штаммов, каждый из которых синтезирует токсин, специфичный в отношении определенных видов насекомых. Инсектицид или белковый токсин образуется в клетках бактерий во время споруляции и представляет собой параспоральную кристаллическую структуру, на долю которой приходится до 30% от сухой массы спорулирующих клеток. Все токсины *B.thuringiensis* можно разделить на четыре основных класса, каждый класс на подклассы и далее на подгруппы согласно последовательностям аминокислот соответствующих токсинов. Гены многих из них клонированы. В клетках бацилл токсины находятся в виде неактивных протоксинов. После заглатывания насекомым протоксин активируется в кишечнике под действием протеиназ в активный токсин, который встраивается в мембрану эпителия кишечника насекомого и образует канал, через который происходит утечка АТФ. Через 15 мин клеточный метаболизм таких насекомых блокируется, насекомое перестает питаться и погибает. Генная инженерия генов токсинов бактерии *B.thuringiensis* (*cry*-гены) направлена прежде всего на получение их суперэкспрессии. С другой стороны, ущерб растениям наносят сразу несколько видов насекомых, поэтому исследования также направлены на создание микробных инсектицидов широкого спектра действия. Это достигается путем векторного переноса гена токсина в реципиентные клетки бактерий *B.thuringiensis*, синтезирующих другой видоспецифичный токсин. Как правило спектр токсичности рекомбинантного штамма расширяется: сохраняется токсичность, характерная для штамма, и приобретается токсичность введенного гена. Другой подход осуществляется комбинированием фрагментов генов разных видоспецифичных токсинов с получением последовательности, кодирующей токсин двойного действия (гибридный токсин). Интересно, что на практике рекомбинантный штамм мог оказывать токическое действие на

насекомое, на которое не действовал ни один из продуктов исходных генов. Плазмидные векторы, несущие клонированные *cry*-гены часто оказываются нестабильными и утрачиваются, поэтому целесообразна их интеграция с хромосомной ДНК бактерий. *cry*-Гены вводили в *B. subtilis*, в водные микроорганизмы для борьбы с личинками комара, а также в бактерии ризосферы для борьбы с насекомыми, повреждающими корни растений.

Биоинженерные удобрения разрабатываются на основе бактерий, эффективно стимулирующих рост растений. В этом отношении наиболее детально изучены семейства *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*, способные к симбиотическим отношениям с растениями и обладающие азотфикссирующей активностью. Фиксация азота – это сложный процесс, который обеспечивают семь координированно регулируемых оперонов (*nif*-гены), кодирующих 20 различных белков. Для синтеза активной нитрогеназы, ферментного комплекса, ответственного за фиксацию азота, все *nif*-гены должны быть в активном состоянии. Введение в недиазотрофный штамм-реципиент одного или двух *nif*-генов недостаточно, чтобы клетки приобрели способность связывать азот, что указывает на сложность процесса фиксации азота микроорганизмами. Тем не менее, введение с помощью методов генной инженерии дополнительных копий *nif*-генов приводит к увеличению биомассы растений-симбионтов. Побочной реакцией азотфиксации является восстановление нитрогеназой H^+ до H_2 (газообразный водород), в ходе которой энергия расходуется на образование водорода. Устранить эту побочную реакцию прямым путем невозможно. Оказалось, что некоторые штаммы *Rhizobium* синтезируют гидрогеназу, катализирующую превращение H_2 в H^+ , что существенно увеличивает эффективность фиксации азота. Если штамм содержит неактивную гидрогеназу (*hup*-гены). Генно-инженерные модификации и векторный перенос *hup*-генов в азот фиксирующие штаммы-реципиенты приводит также к увеличению способности стимулировать рост растений. Штаммы *Rhizobium* стимулируют образование на корнях растений клубеньков, где происходит размножение этих бактерий и фиксация азота. Используя прием генетической комплементации

проводили идентификацию генов (*nod*-гены) образования клубеньков. Выявлен набор *nod*-генов, продукты которых задействованы в образовании клубеньков и регуляции этого процесса. В целом, эти гены кодируют около 20 белков, исследуется роль каждого из них. Из-за множества генов и сложности анализа пока не удалось разработать простых генетических подходов, которые позволили бы использовать *nod*-гены для повышения конкурентоспособности инокулирующих штаммов *Rhizobium*. Будущее связывают с секвенированием и анализом геномов азотфиксаторов и выявлением локусов, ответственных за синтез клубеньков: не исключено, что будут идентифицированы новые *nod*-гены, активно влияющие на процесс. Кроме того, с помощью методов генной инженерии на основе модификации *nod*-генов пытаются создать штаммы *Rhizobium* с более широкой специфичностью в отношении растений-симбионтов.

Благоприятно влияют на рост и развитие растений и другие свойства микроорганизмов. Бактерии способны участвовать в защите растений от фитопатогенных грибов и бактерий. Защита осуществляется посредством синтезируемых бактериями соединений, антибиотиков и различных ферментов, например, фитаз, которые расщепляют нерастворимые соединения почвы (фитаты) для утилизации растениями неорганических фосфатов. В будущем гены биосинтеза этих соединений будут использованы для создания средств защиты растений и инновационных биоудобрений.

Генетическая инженерия растений

Генетическая инженерия растений заключается в переносе в растительные организмы чужеродных генов, которые обуславливают новые полезные свойства рекомбинантных растений. Получение трансгенных растений важно по следующим причинам: во-первых, введение гетерологичных генов часто приводит к повышению сельскохозяйственной ценности и декоративных качеств растений, что обеспечивает их высокую конкурентоспособность; во-вторых, доступность трансгенных растений, которые могут производить полезные для человека продукты при минимальных экономических затратах; в третьих, растения являются удобными моделями для изучения действия новых

генов в ходе полного цикла биологического развития организма. Методология генетической инженерии растений направлена на изменение методов традиционной селекции, чтобы желаемые признаки растений можно было получать путем введения в хромосомную ДНК соответствующих генов вместо длительной и трудоемкой селекции. В целом, стратегия получения трансгенных растений аналогична для микроорганизмов и животных: необходимо сконструировать гетерологичную ДНК, несущую целевые гены, найти оптимальный способ ее введения в клетки растения и получить стабильную экспрессию продукта. Тем не менее, в отличие от микроорганизмов, растительные геномы на порядки больше по объему, имеют гораздо более сложное строение (высокая полидиплоидность, превалирующее количество некодирующей ДНК, включающую сателлитную и мобильную ДНК), не содержат плазмид, а главное, число секвенированных геномов в мировых базах данных, гораздо меньше, чем других организмов в силу трудоемкости ее секвенирования. Чужеродная ДНК встраивается в хромосомную ДНК растений, поэтому необходимо контролировать, в какой именно ткани растений ожидается экспрессия целевых генов (путем подбора специфических промоторов). Дополнительной сложностью является то, что в геноме растений и других эукариот не все участки транскрибируются, что означает, что экспрессия чужеродного гена будет зависеть от вида ткани. Также растения имеют одно очень важное преимущество перед животными, а именно возможна их регенерация *in vitro* из недифференцированных соматических тканей с получением способных завязывать жизнеспособные семена, что обеспечивает передачу желаемого признака последующим поколениям растений. Таким образом, тотипотентность открывает для генных инженеров перспективу в направленной селекции растений, а также в изучении функционирования новых генов. Для такого конструирования необходимо выделить конкретный ген, разработать методы его включения в наследственный аппарат растительной клетки и далее регенерировать из единичных клеток нормальное жизнеспособное растение с измененным генотипом. В отличие от животных

растительные клетки имеют клеточную оболочку, которая затрудняет доставку в них ДНК. Поэтому технология получения трансгенных растений из единичных клеток расширяет возможности генно-инженерной методологии.

Для создания трансгенных растений используют два пути: первый – это векторный перенос чужеродной ДНК путем трансформации его агробактериями, а второй - методы прямого переноса генов в клетки растений.

Генетическая трансформация растений основана на природном процессе. В основе – инфекционный процесс, а именно, заражение растений почвенными бактериями рода *Agrobacterium*. Несколько видов этих бактерий могут заражать растения и вызывать образование опухолей (корончатые галлы), растущие в месте заражения. Клетки корончатых галлов способны к нерегулируемому росту и сохраняют эти свойства, даже если убить бактерии антибиотиками. Изучение индуктора опухолей *Agrobacterium tumefaciens* показало, что этому способствуют плазмиды, которые частично интегрируются в хромосомы растений. Таким образом, у фитопатогенных агробактерий реализуется редкая форма паразитизма, связанная с внедрением в геном растений части собственной бактериальной ДНК. Таким образом, эти микроорганизмы от природы способны осуществлять задачи генной инженерии.

Суть инфекционного процесса в следующем (Рис. 22). Заболевание определяется экспрессией в растительном геноме специфического сегмента бактериальной плазмиды, он называется Т-ДНК, размером до 24 кб. Т-ДНК входит в состав бактериальной Ti-плазмиды (*tumor inducing* – индуцирующая опухоль) размером до 200 кб. Кроме Т-сегмента в плазмиде есть еще два принципиально важных участка: *vir*-участок – гены вирулентности, которые обеспечивают перенос Т-ДНК и соп-участок, который обеспечивает процесс коньюгации плазмиды. В области Т-ДНК картировано не менее шести генов, отвечающих за морфологию опухоли и синтез фитогормонов. Во-первых, Т-ДНК содержит гены ферментов, необходимых для синтеза регуляторов роста растений (ауксин и цитокинин).

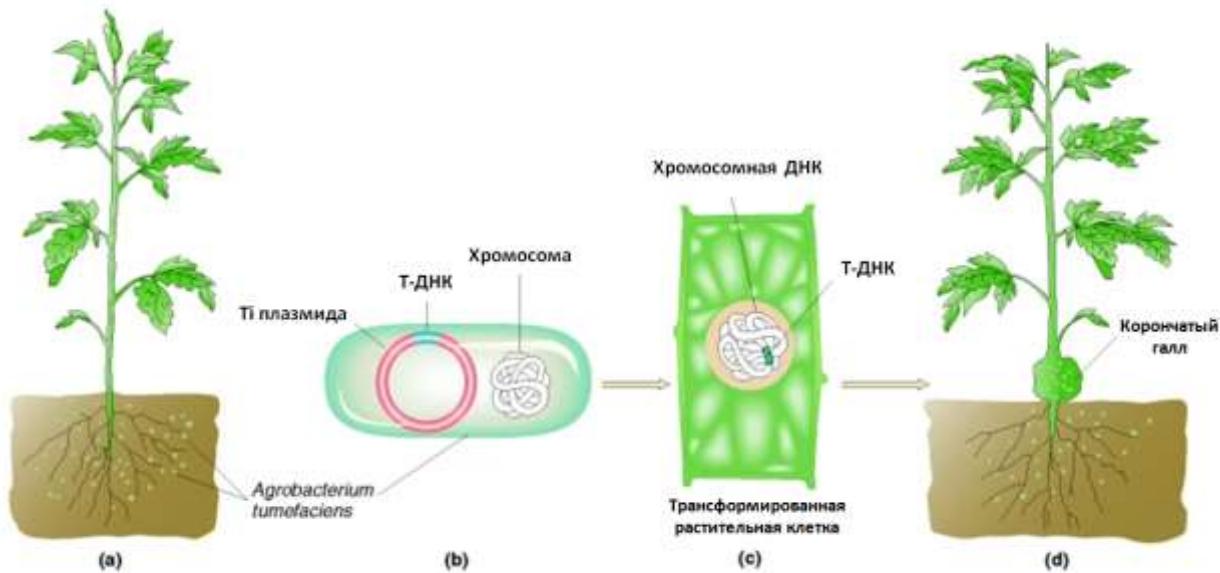


Рис. 22 . Схема природной трансформации растений агробактериями. а) Растущее растение, ризосфера которого инокулирована агробактериями; б) *Agrobacterium tumefaciens*, несущие Ti-плазмиду с локализованной в ней Т-ДНК; в) перенос Т-ДНК из плазмиды в хромосомную ДНК растительной клетки; г) образование корончатых галлов растений следствии экспрессии бактериальной Т-ДНК. [Modern Genetic Analysis. Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, et al. New York: W. H. Freeman; www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21428/]

В трансформированных клетках растений идет усиленное образование этих гормонов, что вызывает разрастание ткани. Поэтому эти бактериальные гены считаются онкогенами. Бактериальная Т-ДНК также содержит гены опинсинтаз для синтеза необычных аминокислот, называемых опинами. В зависимости от типа Ti-плазмиды, опухолевые клетки образуют опины различных типов, из них наиболее известны нопалин и октопин – производные аргинина. Эти модифицированные аминокислоты не образуются в растительных клетках, но не используются растениями, а необходимы для паразитирующих бактерий, и используются ими как источники углерода и азота. Бактериальные гены, необходимые для поглощения и катаболизма опинов, локализованы в Ti-плазмидах и поэтому опины используются только штаммами агробактерий, а не другими почвенными бактериями. Агробактерии, лишенные Ti-плазмид, не индуцируют в зараженном растении ни образования корончатых галлов, ни

синтеза опинов. Таким образом, растительные клетки, которые экспрессируют эти гены, становятся источником питания для бактерий.

В переносе Т-ДНК участвуют продукты кластера *vir*-генов Т₁-плазмида (рис. 23). В результате такого переноса Т-ДНК встраивается в геном растительной клетки.



Рис. 23. Схема строения Т₁-плазмида: Т-ДНК содержит гены регуляторов роста растений, ответственных за онкотрансформацию растительных клеток и синтез нопалинов, модифицированных аминокислот, служащих источником питания для агробактерий. *vir*-Гены кодируют белки, обеспечивающие перенос Т-ДНК в растительную клетку. [Modern Genetic Analysis. Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, et al. New York: W. H. Freeman; www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21428/]

Агробактерии самостоятельно не способны разрушать растительную клеточную стенку. Трансформация растений происходит в местах повреждения клеточной стенки растений. Индукция переноса бактериальной ДНК происходит под действием фенольных соединений, освобождающихся в участках повреждения растительной ткани. Индукцию *vir*-генов стимулирует также присутствие ряда сахаров, например, арабиноза или галактоза. Оптимальные условия индукции обусловлены штаммом агробактерий и типом растения-хозяина. Индукцию *vir*-генов индукторами растительного происхождения опосредует двухкомпонентная регуляторная система сигнальной трансдукции, включающая гистидиновую протеинкиназу VirA в

качестве сенсорного компонента и фактор транскрипции VirG в качестве ответного регулятора. Белок VirA дважды пронизывает внутреннюю мембрану бактериальной клетки и выступает в качестве донора фосфата для белка VirG, который в фосфорилированной форме активирует транскрипцию *vir*-генов, связываясь с последовательностью ДНК длиной 12 п.н. (*vir*-боксы). Активация *vir*-генов под контролем этой сигнальной системы обеспечивает вырезание Т-ДНК, ее перенос в клетки растений и интеграцию в геном растений. Индукция *vir*-генов обратима, что очень важно для патогена: в случае, если хозяин нежизнеспособный, перенос Т-ДНК не осуществляется. В сайт-специфичном вырезании Т-ДНК участвуют продукты генов оперона *virD*, один из них является эндонуклеазой. Область Т-ДНК окружена одинаковыми повторами, которые являются сайтами узнавания для VirD-эндонуклеазы. После удаления концевых повторов высвобождается линейная одноцепочечная Т-ДНК. С ней связывается белок VirE, способный защищать Т-ДНК от действия расщепляющих ферментов. Т-ДНК покрывается примерно 200 молекулами этого белка для сохранения и переносится через специфические каналы, образованные VirB-белком в растительную клетку. VirB – это мембранный или периплазматический белок, образующий пору, через которую выходит Т-ДНК. Перенос основан на белок-белковом взаимодействии, Т-ДНК полностью замаскирована белками и ее нуклеотидный состав не нарушается и не влияет на процесс переноса. Т-ДНК должна проникнуть в ядро. Перенос через ядерную мембрану происходит через поры и опосредуется участками узнавания к VirE белку. В отличие от мобильных элементов, Т-ДНК не несет гены специальных ферментов для встраивания в геном растительной клетки (Рис. 24).



Рис. 24. Схема Т-ДНК в Ti-плазмидном векторе агробактерий: нопалиновый участок содержит гены для синтеза необычных аминокислот, активация генов регуляторов роста растений в растительных клетках приводит к развитию корончатых галлов.

Интеграция Т-ДНК происходит случайным образом, не обнаруживая избирательности в отношении геномных локусов, но, по-видимому, предпочтительно в областях активной транскрипции.

Конструирование генетических векторов на основе Ti-плазмиды.

Конструирование осуществляют путем замены Т-ДНК в Ti-плазмидном векторе агробактерий на чужеродные гены. А именно, Т-ДНК может быть вырезана и заменена нуклеотидную последовательность, которую хотят ввести в растение. Удаление нативной Т-ДНК из плазмиды приводит к тому, что болезнь не развивается. Вырезание/встраивание осуществляют рестриктазами и лигазами. К чужеродным генам подстыковывают растительный промотор или промоторы фитовирусов. Иногда подстыковывают промоторы, обеспечивающие тканеспецифичную экспрессию чужеродного гена. Широко используются промоторы, под контролем которых гены экспрессируются конститутивно. Природная Ti-плазмиды содержит участки, которые не требуются для искусственной трансформации, поэтому их удаляют, а из природных плазмид конструируют более мелкие векторы, с которыми удобнее работать. Обязательным условием является сохранение в плазмиде пограничных последовательностей Т-ДНК и присутствие в составе вектора *vir*-генов. Отбор трансформантов осуществляют на селективных средах, для этого в векторную конструкцию вводят селективный маркерный ген, обычно ген устойчивости к антибиотику или репортерный ген. Достоинством векторного переноса является возможность манипулировать с генами, недостатком – встраивание гетерологической ДНК в случайные локусы растительной ДНК, что преодолеваются путем использования специфичных промоторов. Кроме того, векторный перенос лимитирован применением ограниченного числа видов растений, на которых паразитируют агробактерии. Более того, на практике получают более сложные конструкции, предназначенные для переноса в растения, которые по размеру не вмещаются в бактериальную плазмиду. Поэтому разработаны и другие способы генетической трансформации растений.

Наряду с векторным переносом осуществляют прямой перенос ДНК без участия микроорганизмов. К таким методам относится метод соматической гибридизации. Он заключается в слиянии протопластов растительных клеток. Таким образом, в клетку можно ввести большой объем ДНК, а чем больше ДНК, тем выше вероятность встраивания гетерологичной ДНК. Недостатком этого метода является отсутствие прогнозирования результата. Другой подход заключается в том, что клеточную стенку растений удаляют ферментами и в протопласти вводят чужеродную путем микроинъекций микрошприцом под контролем микроскопа, электропорацией или слиянием с липосомами, содержащими ДНК. Упаковка в липосомы используется для защиты экзогенного генетического материала от разрушающего действия рестриктаз. Липосомы - сферические оболочки, состоящие из фосфолипидов. Получают их путем резкого встряхивания смеси водного раствора и липидов, либо обрабатывая ультразвуком водные эмульсии фосфолипидов. Липосомы, состоящие из фосфатидилсерина и холестерина наиболее пригодны для введения ДНК в клетки животных и растений. Системы переноса с помощью липосом низкотоксичны по отношению к клеткам.

Один из самых эффективных методов трансформации растений, особенно однодольных - это метод генной пушки. Для этого векторная ДНК напыляется на мельчайшие частички металла (размером до 1 мкм). Частички с ДНК наносят на подложку и помещают внутрь пушки. Растительные клетки наносят на агаризованную среду в чашку Петри и она помещается под пушку на расстоянии около 10 см. Давление в пушке уменьшают до 0.1 атм, в момент сброса давления частицы с огромной скоростью выбрасываются из пушки, стремительно проходят через клеточные стенки растений и проникают в цитоплазму и ядро клеток. Среди множества клеток, подвергнутых бомбардировке, имеются клетки, в которых трансформация прошла успешно. Клетки осторожно переносят на среду для отбора, культивирования и регенерации. Присутствие чужеродных генов устанавливают с помощью метода ПЦР или постановки активности. С помощью генной пушки получены

трансгенные кукуруза, рис, пшеница, ячмень, растения-трансформанты отличались стабильностью. Кроме успехов в получении трансгенных однодольных, трансформация генной пушкой применяется для прямого переноса ДНК в пыльцу. Этим методом проведена трансформация растений табака и получены стабильные трансформанты.

Трансформация хлоропластов. Высокий уровень экспрессии в трансгенных растениях достигается при трансформации хлоропластов. Каждая клетка содержит до 100 хлоропластов, в каждом из которых содержится от 50 до 100 копий дуплексной кольцевой молекулы ДНК. Таким образом, в отличие от ядерной трансформации трансформация в хлоропласти сопровождается увеличением копийности чужеродного гена. Экспрессия в ядерных трансформантах в значительной степени зависит от места встраивания. Сайт-специфическая интеграция целевых генов в ДНК хлоропластов обеспечивает отсутствие инсерционного мутагенеза. Хлоропласти имеют собственные системы трансляции и транскрипции, близкие прокариотическим, что облегчает использование при трансформации бактериальных генов. Протопласти наследуются как цитоплазматические элементы, что обеспечивает их наследование по материнской линии. В результате чужеродные гены остаются только в культуре, которая была генетически модифицирована. Важно, что в настоящее время секвенирована ДНК хлоропластов более двух десятков важнейших культурных растений, что обеспечивает развитие этой технологии.

Практическая значимость трансгенных растений для нужд сельского хозяйства. Острая проблема в сельском хозяйстве – это получение растений, устойчивых к вирусам. Одна из методологий получения безвирусных растений – это иммунизация вирусными генами. Для этого отдельные вирусные гены, например, ген капсидного белка вируса вводят в геном растения. В этих условиях инфицирующая способность вируса резко снижается. Ингибирование вирусной инфекции происходит за счет механизма РНК-интерференции, в результате происходит высокоизбирательное расщепление вирусной мРНК в присутствии комплементарной ей молекулы дsРНК. Противовирусное действие

проявляется на уровне трансляции и препятствует образованию зрелых вирусных частиц. Этим способом получены уже различные трансгенные растения, устойчивые к фитовирусам.

Другой метод получения безвирусных растений – введение в растительную клетку антисмысловой РНК (асРНК). асРНК образует дуплекс с мРНК и блокирует трансляцию. В *in vitro* экспериментах синтез белкового продукта в присутствии асРНК существенно снижается, что легло в основу метода получения безвирусных растений. Для этого в растительные клетки вводят ген, кодирующий асРНК, комплементарную мРНК вирусного белка оболочки. Введение такого гена позволяет контролировать экспрессию интересуемого гена. Показано, что экспрессия такого гена снижала, но не блокировала развитие инфекции.

Защита растений от вирусов также обеспечивается также с применением противовирусных белков. Такие белки синтезируются самими растениями, а также бактериями, это рибонуклеазы и нуклеазы, обе расщепляют вирусную нуклеиновую кислоту. Гены этих белков клонируют и используют для получения трансгенных растений., устойчивых к широкому спектру вирусов.

Растения, устойчивые к насекомым. Для создания устойчивых к насекомым растений в растительный геном встраивают ген бактериального токсина, выделенный из *Bacillus thuringiensis* (эти почвенные бактерии вызывают болезни насекомых, выделяя Bt-токсин). Трансгенные растения, способные к синтезу Bt-токсина, проявляют устойчивость к некоторым из вредителей. Это позволяет снизить применение пестицидов на полях, что уменьшает загрязнение окружающей среды. Наиболее безопасные проекты связаны с трансгенным хлопчатником, синтезирующим бактериальный Bt-токсин. Другая сельскохозяйственная масленичная культура – это устойчивый к насекомым трансгенный рапс, такие растения позволили получить техническое растительное масло с меньшими затратами. Основным преимуществом в использовании Bt-растений является увеличение урожайности и уменьшение использования гербицидов и инсектицидов.

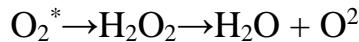
Улучшение качества пищевых сельскохозяйственных продуктов. Многие растительные продукты содержат недостаточные количества незаменимых аминокислот и витаминов. Этот недостаток преодолевают, внедряя в растительный геном гены, ответственные за биосинтез запасных белков, в которых чаще считываются кодоны незаменимых для человека аминокислот, прежде всего - лизина. Созданы сорта масленичных культур с измененным составом жирных кислот в плодах (соя, рапс, подсолнечник). Улучшается вкус фруктов путем введения гена белка, имеющего сладкий вкус. В настоящее время получены трансгенный рис с повышенным содержанием каротиноидов, трансгенная соя с улучшенным белковым составом.

Улучшение товарных качеств растений. Изменение вкуса, внешнего вида и сохранности плодов важно для реализации сельскохозяйственной продукции. При созревании плодов растений активируются различные гидролитические ферменты. Были созданы трансгенные растения, в которых синтезировались антисмыловые РНК-версии этих генов. Такой подход использован для получения трансгенных томатов с улучшенным качеством плодов. Вектор включал кДНК гена полигалактуроназы, участвующей в расщеплении пектина, основного компонента межклеточного пространства растительных тканей. Полигалактуроназа синтезируется в период созревания плодов томатов, увеличение ее количества приводит к тому, что томаты становятся более мягкими, что значительно сокращает срок их хранения. Были созданы трансгенные растения, в которых синтезировались антисмыловые РНК-версии этих генов. Отключение этого гена в трансгенах позволило получить растения томатов с новыми свойствами плодов, которые не только значительно дольше хранились, но сами растения были более устойчивы к грибным заболеваниям. Таким образом, стратегия антисмыловых конструкций применима для модификации экспрессии генов и используется не только для получения растений с новыми свойствами, но также для фундаментальных исследований в генетике растений.

Изучение генетической регуляции развития цветка позволяет создавать махровые сорта разнообразных декоративных растений, которые пользуются большим спросом на рынке. Кроме того, в растения можно ввести гены, отвечающие за синтез пигментов и получить необычную окраску (например, получены трансгенные петунии с цветками желтого цвета). Интересным представляется экспрессия в трансгенных растениях белков, светящихся в темноте, или флуоресцирующих белков, что придаст растениям принципиально новые декоративные качества.

Растения, устойчивые к гербицидам. Одной из технологий, позволяющей уделить борьбу с сорняками, является получение гербицид-устойчивых культурных растений. Для этого можно ввести в геном растений ген устойчивости к гербициду, модифицировать ген белка, чувствительного к гербициду или модифицировать гены, продукты которых контролируют поглощение гербицида растениями. Обработку полей с гербицид-устойчивыми культурами можно проводить весь сезон, что улучшает урожай и одновременно ведет к избытку этих агентов на полях, приводя к накоплению гербицидов или продуктов его деградации в сельскохозяйственных продуктах. Если для технических культур это сравнительно безопасно, то использовать в пищу трансгенные гербицид-устойчивые культурные растения может оказаться опасным. Многие гербициды признаны опасными для рыб, моллюсков и др. животных. Сток гербицидов с полей в водоемы также усиливается. Таким образом, использование гербицид-устойчивых трансгенных растений должно быть оправдано не только экономическими критериями, но также обосновано экологически и социально, чтобы не нанести вред биосфере.

Повышение устойчивости растений. Неблагоприятные воздействия окружающей среды сопровождаются физиологическими стрессами. Следствием является образование свободных радикалов кислорода. Наиболее распространенным радикалом является супероксид-анион. Фермент супероксид-дисмутаза нейтрализует это соединение, превращая в перекись водорода, которая превращается в воду любой из клеточных пероксидаз:



Работы по созданию растений, устойчивых к окислительному стрессу, предполагают перенос в растительные геномы генов, ответственных за синтез супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и др. ферментов под сильными промоторами, что повышает их устойчивость к свободнорадикальным процессам. Трансгенные растения табака, несущие ген супероксид-дисмутазы из хлоропластов, были устойчивы к засухе, яркому свету. Растения приобретали также дополнительные свойства, они становились более устойчивы к гербицидам. Супероксид-дисмутаза способствует также сохранению срезанных цветов при транспортировке, их увядание также является следствием образования свободных радикалов кислорода. Возможно, такие разработки окажутся актуальными для высокогорных областей с высокой UV-радиацией. По-видимому, эти растения окажутся менее чувствительными к радиоактивным загрязнениям.

В ответ на разные стрессовые воздействия, засоление, засуху, холод и др., в клетках растений активно синтезируется пролин. Эта аминокислота обладает уникальными свойствами - ее раствор в воде даже в высоких концентрациях не нарушает структуру белков, поэтому она может “работать” в качестве осмопротектора. Уровень пролина и повышение стрессоустойчивости растений можно изменить либо усилив его синтез, либо снизив скорость его распада. Были проведены эксперименты по получению растений табака, несущих антисмысловой участок гена пролиндегидрогеназы - фермента, разрушающего аминокислоту пролин. С использованием асРНК был снижен уровень экспрессии гена пролиндегидрогеназы, что сказалось на увеличении содержания пролина в клетках и повышении неспецифической стрессоустойчивости (к засолению, засухе, солям тяжелых металлов и др.).

Для нашей страны актуально получение морозостойких сортов растений. Основным повреждающим агентом при замерзании является кристаллический лед. Для предотвращения его образования некоторые рыбы и насекомые

выделяют особые гидрофильные белки. Гены этих белков можно перенести в растения, и их морозостойкость повысится.

Растения биореакторы – это растения, способные синтезировать коммерческие продукты: инсулин, антитела и др. белки для нужд медицины. Производство генно-инженерных белков в трансгенных клетках бактерий практикуют уже давно. Однако, возникает проблема правильной модификации таких белков в бактериальных клетках. Часто белок так и не принимает нужной конформации или слегка отличается по аминокислотному составу, что нежелательно. Растения являются эукариотическими организмами, способными синтезировать аутентичные белки, поэтому было предложено получать белки для нужд медицины из трансгенных растений. Можно создать условия для синтеза чужеродных белков в семенах, в которых их целостность не нарушится длительное время. Поскольку выращивание растений является доступной и освоенной методологией, а получаемый при этом продукт будет аутентичен человеческим белкам, можно ожидать большого экономического эффекта от внедрения этой технологии. В медицинской практике используется не вся биомасса растения, а выделенный из нее индивидуальный компонент (белок), т.е. препарат проходит предварительную очистку и должен быть безопасным для здоровья людей.

Подводя итог можно заключить, что несмотря на многочисленные запреты и дискуссии, практическое применение трансгенных растений уже началось. Оценка возможных рисков должна проводиться на основании анализа используемой технологии. Для технических и декоративных культур риск применения трансгенных растений минимален. В тех случаях, когда технология действительно экологически опасна, нужны действенные меры по контролю качества продукции и оценке отдаленных последствий ее применения.

Области применения трансгенных растений многообразны, к сожалению, в нашей стране эти технологии пока лимитированы. Если экономическая выгода от использования генетически модифицированных растений очевидна, то их безопасность вызывает опасения и дискуссии. Хотя до сих пор не получено ни

одного подтверждения вредоносных качеств трансгенных растений, преувеличение их опасности связано с недостатком знаний и информации.

Генетическая инженерия животных

Получение генетически модифицированных животных, трансгенных животных, в которых экспрессируются чужеродные гены, направлено на получение новых генетических линий, которые сохраняют исходные полезные признаки и приобретают новые. Эксперименты по получению трансгенных животных направлены на включение в хромосомы животных как отдельных функциональных генов так и целых генных кластеров. Животное, чей генотип изменяется путем введения чужеродной ДНК, называют *трансгенным*, вводимая ДНК – *трансгеном*, а процесс – трансгенной технологией или *трансгенозом*.

Начало эпохи клонирования уходит в 40-е годы прошлого столетия, когда российский эмбриолог Георгий Викторович Лопашов впервые в мировой практике разработал метод трансплантации ядер в яйцеклетку лягушки. В 1948 году он отправил статью по результатам экспериментов в российский «Журнал общей биологии». Статья не вышла в связи с постановлением государственных органов (от 1948 г.) о запрете науки генетики в России. Позже в 50-е годы аналогичные эксперименты опубликовали американские эмбриологи Бриггс и Кинг и научный приоритет достался им. В дальнейшем Дж. Гердон из Великобритании добился того, что яйцеклетки лягушек с чужеродным ядром соматической клетки развивались и давали потомство. В 1982 г. на обложку журнала “Nature” поместили фотографию двух десятинедельных мышей, из которых одна была больше другой в два раза (фотография из статьи в этом же номере журнала). Большая из 2-х мышей была трансгенной мышью, в эмбрион которой введен чужеродный ген - ген гормона роста крысы. После публикации этой статьи начались многочисленные эксперименты по созданию трансгенных животных.

Сегодня трансгенная биотехнология животных – это быстро развивающееся направление генной инженерии, методология которой разрабатывалась на лабораторных мышах. С начала 80-х в различные линии мышей были введены самые разные гены с целью исследования фундаментальных биологических процессов и многих заболеваний. Введение чужеродной ДНК в организм животного можно осуществить разными методами: с помощью ретровирусных векторов, микроинъекцией ДНК, с помощью стволовых клеток, переносом ядра и с помощью искусственных хромосом.

Использование ретровирусных векторов. Для получения линии трансгенных мышей эмбрион на стадии 8 клеток инфицируют рекомбинантным ретровирусом, несущим трансген. «Суррогатные матери», которым имплантируют эмбрион, производят трансгенное потомство. Для идентификации трансгена трансгенных мышат скрещивают для получения особей, гомозиготных по трансгену, и анализируют с помощью ДНК-гибридизации клетки из кусочков кончиков хвостов. При использовании этого метода размер вставки ограничен 8000п.н. Кроме того, ретровирусные вектора способны реплицироваться в организме трансгенного животного, что нарушает допустимые критерии для применения трансгенных животных в практических целях.

Поэтому используют технику микроинъекций ДНК. Метод включает выделение из самок-доноров яйцеклеток после их спаривания с самцами. Трансгенную конструкцию иньектируют в оплодотворенные яйцеклетки, которые имплантируют в суррогатную мать для получения трансгенного потомства. Эффективность трангеноза после микроинъекций низкая: после трансфекции трансгенной конструкции в оплодотворенные яйцеклетки, успешной имплантации и появления потомства трансгенные особи составляют менее 5%. Выход значительно ниже для коров, свиней и овец.

Использование эмбриональных стволовых клеток (ES-клетки). Они способны пролиферировать в культуре, сохраняя способность к

дифференцировке в любые типы клеток, включая клетки зародышевой линии при введении в другой эмбрион на стадии бластоцисты. Такие клетки называют полипотентными, их легко модифицировать методами генной инженерии без нарушения этого свойства. ES-Клетки в культуре трансфецируют вектором с чужеродной ДНК. Конструкция кроме чужеродного гена содержит селективный маркер, например, ген устойчивости к неомицину. Тогда при культивировании рекомбинантных клеток на среде с неомицином немодифицированные клетки погибают. Модифицированные ES-клетки вводят в реципиентную бластоцисту, которую имплантируют в суррогатную мать. Анализируют трансгенных животных, некоторые из которых содержат трансген. Таких животных отбирают для скрещивания и получения линии трансгенных мышей. Самый простой способ идентификации ES-клеток, несущих трансген в нужном специфическом сайте сайте, основан на использовании ПЦР. При тестировании трансфецированных клеток один из ПЦР-праймеров (P1) комплементарен участку клонированной последовательности, а второй (P2) – участку хромосомной ДНК, прилегающему к одному из гомологичных участков ДНК. Тогда при встраивании последовательности-мишени в случайный сайт ожидаемый продукт амплификации образовываться не будет, а при сайт-специфическом встраивании амплифицируется ДНК известного размера. Так можно идентифицировать ES-клетки, содержащие трансген в нужном сайте, и путем пересева получить клеточные линии с сайт-специфической вставкой. Такие клеточные линии можно использовать для трансгеноза. Впервые стволовые клетки обнаружены у мышей и технология трансгеноза разработана для них. Впоследствии ES-клетки обнаружены у других млекопитающих, такие клеточные линии получены для золотистого хомячка (1988), овцы (1990), обезьяны (1995), свиньи (1999) и даже человека (1994). Технология ES-клеток открыла новые возможности для создания трансгенных животных с дополнительными введенными генами либо выключенными генами.

Выключение гена называют генным нокаутом. Чтобы ген не экспрессировался нарушают его рамку считывания путем встраивания в кодирующую область чужеродной последовательности (обычно селективного маркерного гена). Для этого создают векторную молекулу, содержащую последовательности, гомологичные фрагментам нарушенного гена-мишени, и ген устойчивости к неомицину. После введения вектора в клетки в результате гомологичной рекомбинации сдвигается рамка считывания гена-мишени и соответствующий ему белок не синтезируется. Экспрессия вставки обеспечивает устойчивость трансгенных клеток к неомицину и облегчает их селекцию на этапах генно-инженерных процедур. В настоящее время для избирательного подавления генной активности используют методологию РНК-интерференции. РНК-интерференция – это посттранскрипционное подавление экспрессии генов с помощью гомологичных им по нуклеотидной последовательности двухцепочечных РНК (дцРНК). При введении в клетки искусственно синтезированных дцРНК наблюдается *избирательное* и эффективное подавление экспрессии гомологичных ей генов. Поэтому синтезируют дцРНК, гомологичную гену-мишени, который необходимо выключить, и вводят ее в клетки. Подавляется экспрессия только гена-мишени. Задача направленного отключения генов состоит в выяснении влияния продуктов этих генов на протекающие физиологические процессы и развитие организма в целом. Такие трансгенные животные могут служить для моделирования болезней человека на молекулярно-генетическом уровне. Например, на мышах с «нокаутированным» геном родопсина, что ведет к инактивации палочек сетчатки, можно изучать процесс дегенерации сетчатки, а также эффект лекарственных средств, оказывающих терапевтическое действие и замедляющих либо останавливающих патологию. Создано более 250 линий мышей с нокаутированными генами для изучения различных заболеваний человека.

Клонирование переносом ядра. Метод заключается в переносе ядра тестируемой клетки в безъядерную яйцеклетку с последующим отбором

потомства. Историческим примером является клонирование овечки Долли [Wilmut et al., 1997]. Для этого первоначально микропипеткой удаляли ядро яйцеклетки. Клетки эпителия молочной железы культивировали и синхронизировали, добивались, чтобы клетки переходили в стадию покоя – G_0 . Затем осуществляли слияние соматических клеток и безъядерных яйцеклеток, восстановленные яйцеклетки выращивали в культуре. На следующем этапе проводили имплантацию яйцеклеток в суррогатную мать, где развивался эмбрион. В эксперименте, описанном Вильмутом, проведено слияние 277 яйцеклеток с удаленными ядрами с клетками молочной железы в фазе G_0 , в результате из 29 образовавшихся эмбрионов только один дал жизнеспособный плод [Wilmut et al., 1997].

Результативность клонирования животных в ранних экспериментах на шпорцевой лягушке была также низкой. В 1976 г. Дж. Гердон и Р. Ласки публикуют работу, в которой описывают опыты с ядрами, выделенными из клеток почек, кожи и легкого уже взрослых шпорцевых лягушек. Исследователи выращивают эти клетки вне организма, а затем вводят их ядра в безъядерные икринки. До 25% таких икринок начинает делиться, но процесс развития пролонгируется. Исследователи выделяют ядра из полученных эмбрионов и снова помещают их в безъядерные икринки. В результате серии подобных пересадок рождаются несколько головастиков. Хотя эти эксперименты привели к получению клонов амфибий, появляющиеся на свет головастики не доживали до стадии взрослых лягушек. Но млекопитающие значительно сложнее лягушки по устройству и степени дифференцированности тканей и выход клонов у них гораздо меньше.

После появления овечки Долли успешное клонирование проведено для мышей (1998), коров (1998), овец (1999), свиней (2000). К настоящему времени накоплено достаточно опыта для анализа этих экспериментов. Результаты клонирования свидетельствуют о массовой гибели эмбрионов в перинатальный период и трагических дефектах в неонатальный период. Перинатальную смертность связывают с нарушениями в регуляции экспрессии генов, и прежде

всего, с нарушением эпигенетической регуляции экспрессии. Именно с нарушениями в экспрессии генов у клонов ассоциируется и неонатальная смертность. Получить генетически идентичную копию организма в настоящее время, по-видимому, невозможно. Клонированные мыши отличаются друг от друга по некодирующей микросателлитной ДНК, которая играет важную роль в регуляции экспрессии. Кроме того для клонирования часто используются соматические клетки. У некоторых организмов в соматических клетках в ходе развития делетированы фрагменты ДНК (дрозофилы). В соматических клетках теломерные последовательности хромосом укорочены по сравнению с теломерами клеток зародышевой линии. Также в матке разных приемных матерей будут различаться условия для развития клонированных эмбрионов, а при развитии зародыша даже совсем незначительные колебания среды могут привести к эпигенетическим нарушениям в регуляции генов. И чем организм более специализирован и выше его положение на эволюционной лестнице, тем эти изменения глубже и менее обратимы. Анализ опыта клонирования различных животных привел к публичному выступлению создателя овечки Долли в 2001 г.: в его соавторстве была опубликована статья в журнале «Science». Статья называлась «Не клонируйте людей!», в которой авторы призывают все попытки клонирования человека признать преждевременными, опасными и безответственными до выяснения всех рисков, связанных с фундаментальными научными вопросами ядерного клонирования. Авторы подчеркивают, что эта позиция относится к экспрессии целых геномов и не распространяется на развитие технологии ES-клеток и генной терапии человека, поскольку в этом случае трансгены экспрессируются в клетках конкретного типа ткани.

Перенос генов с помощью искусственных дрожжевых хромосом. Большинство клонированных эукариотических генов представляют собой кДНК, т.е. небольшие гены размером до 20 кб или фрагменты генов. кДНК плохо экспрессируется в клетках млекопитающих, а полноразмерные эукариотические гены слишком велики для встраивания в обычные векторные

молекулы. Поэтому для получения трансгенных животных можно использовать искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), вмещающие фрагменты геномной ДНК длиной до 1 Мб.

Трансгенных мышей получали микроинъекцией YAC в ядро оплодотворенной яйцеклетки или трансфекцией ES-клеток с помощью YAC, несущих либо несколько генов, либо один большой ген. Трансгенные мыши, содержащие на YAC-хромосоме кластер из пяти функциональных генов β-глобина человека длиной около 250 кб, экспрессировали все эти гены тканеспецифично и в нужное время – также как это происходит у человека. Это определялось наличием во фланкирующих генах последовательностей промоторов и всех необходимых регуляторных элементов. Разрабатывается технология для синтеза человеческих моноклональных антител линиями трансгенных мышей для использования их в медицине.

Для чего используются трансгенные животные? Прежде всего, трансгенные животные рассматриваются как перспективные продуценты лекарственных белков на основе генов человека. В отличие от бактерий в организме животных человеческие белки претерпевают правильные модификации на посттрансляционном уровне – гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, карбоксилирование и др. преобразования. Биохимические механизмы, обеспечивающие эти реакции, отсутствуют у прокариот, и белки, синтезируемые ими с генов человека, не полностью идентичны белкам человеческого организма. Трансгенные дрожжи не имеют эти недостатки, но их продуктивность ниже, чем у трансгенных животных.

Технология построена на получении трансгенных животных, в специализированных клетках которых, и, в частности, в клетках молочной железы, экспрессируются человеческие целевые белки. В этом случае получение лекарственных белков производят путем доения животных, а их последующая очистка проходит из животного молока, и если в препаратах остаются примеси, то это будут контаминирующие молочные белки, нетоксичные для человека. Техника отработана на мышах, получены

трансгенные мыши, способные синтезировать в молоке человеческие интерферон, сывороточный альбумин, урокиназу, интерлейкин-2, супероксиддисмутазу и др. Получены также трансгенные кролики, овцы и козы, активно ведутся работы по получению трансгенных коров.

Другое направление использования трансгенных животных – это моделирование генетических заболеваний. Немногие заболевания имеют моногенную природу, чаще причиной является комплекс нарушений генома, включая механизмы взаимодействия между генетическими и окружающими факторами. Исследования направлены на выяснение генетических основ таких заболеваний. К этой группе относят заболевания мозга и нервной системы, многие эндокринные заболевания. Идентифицированные гены нейродегеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и хорея Гентингтона, уже используются в моделировании на трансгенных животных. Для многих заболеваний трудно установить причину, поэтому привлекаются трансгенные модели. Идентифицированы гены, продукты которых участвуют в развитии эпилепсии. Некоторые воспалительные и иммунологические заболевания имитируют с помощью одноступенчатого трансгенеза, например, ревматоидный артрит. Получены мыши, содержащие гены ВИЧ-1 для выяснения путей развития этого заболевания и борьбы с ним. Моделируются болезни, связанные с липидным обменом, с развитием сердечно-сосудистых заболеваний и гипертонии. Понимание молекулярно-генетических механизмов формирования заболеваний с помощью трансгенных животных важно для развития профилактики и диагностики. Среди млекопитающих наиболее развита техника моделирования на мышах. Создают два типа моделей: мыши с функционирующим трансгеном и мыши с утратой функции данного гена. На первой модели исследуют взаимосвязь экспрессии гена и степенью заболевания, на второй модели – конкретную функцию гена, его роль в заболевании, что особенно важно при анализе причин мультигенных болезней. Разработка методов генной терапии – наиболее актуальное направление в применении трансгенных животных. Эти исследования

актуальны в борьбе с онкозаболеваниями и спидом, а также другими соматическими болезнями. Используется соматическая трансфекция, когда генетические конструкции вводятся в определенные клетки пациента.

Перспективу в развитии *новых* трансгенных технологий связывают с созданием трансгенных животных – источников органов для пересадки человеку. Например, органы свиньи подходят человеку по строению, размеру и биохимическим показателям. Их прямая пересадка невозможна, они будут отторгнуты иммунной системой пациентов. Проблема может быть решена путем создания трансгенного животного с человеческими генами гистосовместимости.

Технологией трансгеноза получены трансгенные коровы, овцы, свиньи, птицы и рыбы. Возможно, развитие этой техники позволит получать улучшенные породы домашних животных с новыми свойствами. Кроме того, трансгенных коров, овец и коз будут использовать для получения полезных для человека продуктов, которые секретируются в молоко. Особые надежды связывают с моделированием генных болезней человека и разработкой методов их преодоления. Клонирование животных для использования их как фабрик гормонов для людей уже развивается усиленными темпами. Возможно будут и другие области применения трансгенных животных, но очевидно одно, что развитие и прогресс этой технологии, также как и микробной биотехнологии, неразрывно связан с будущим человечества.

Генетическая инженерия человека

Исследования по генетической инженерии человека значительно интенсифицировались в ходе выполнения программы «Геном человека». Цель проекта секвенировать нуклеотидные последовательности ДНК хромосом человека. Проект завершен в 2002 г., составлена полная карта генома человека и в настоящее время идут исследования по локализации в ней всех генов. Идентифицированы многие гены, контролирующие развитие заболеваний или предрасполагающих к ним. Выявлены гены, ответственные за высокое артериальное давление, меланому, регуляцию роста, артрит, рак груди,

сердечно-сосудистые заболевания, болезнь Паркинсона, установлена генетическая основа некоторых психических заболеваний, таких как аутизм, аффективные расстройства, шизофрения и другие. Таким образом, практический потенциал программы «Геном человека» нацелен на биомедицинские исследования.

Генодиагностика – это выявление генов, ответственных за заболевания человека. Их идентификация позволит поставить точный диагноз и выбрать путь лечения, провести раннюю диагностику, выявить предрасположенность к ряду соматических и психических заболеваний и принять соответствующие профилактические меры. Для генодиагностики проводят исследование белка, например, гемоглобина или альфа1-антитрипсина (масс-спектрометрия и двумерный электрофорез), РНК (ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени) или ДНК (чипы, гибридизация, ПЦР и блоты). Основной приоритетный метод – это исследование ДНК. ДНК-диагностику в настоящее время применяют в медицинской практике для выявления мутаций при наследственных, а также приобретенных заболеваниях и при ДНК-типирования организмов (табл. 3).

Таблица 3. Применение ДНК-диагностики в медицине

<http://humbio.ru/humbio/genexp/001b28d7.htm>



Эта методология в основном применима для обнаружения моногенных заболеваний. Ее проведение при полигенных, а иногда мультифакториальных болезнях, обусловленных многочисленными генами и ненаследственными факторами, пока затруднена. Их исследования проводят на более простых моделях (дрозофилы и трансгенные мыши).

Методы ДНК-диагностики основаны на том, что короткие олигонуклеотиды (зонды или праймеры), при добавлении в пробы в процессе ренатурации нуклеиновых кислот благодаря комплементарным взаимодействиям соединяются с тем участком нуклеиновой кислоты, который содержит последовательность нуклеотидов, строго соответствующую последовательности нуклеотидов зонда или праймера (Рис. 25).

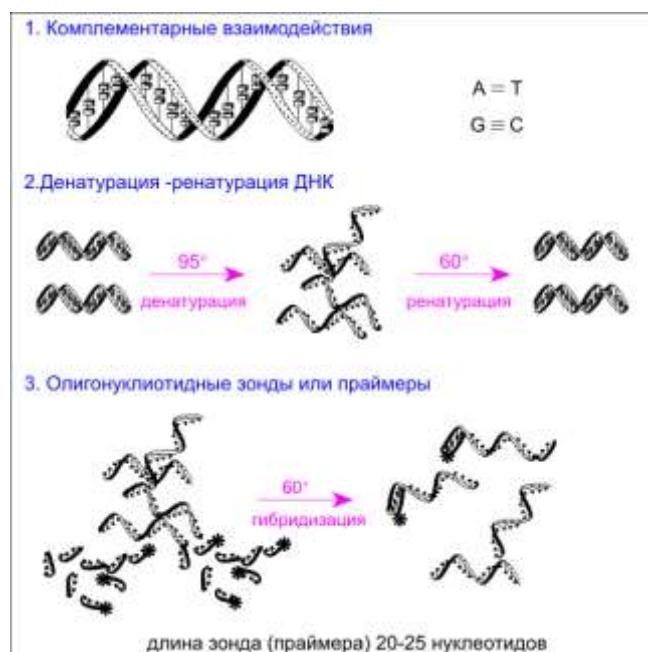


Рис. 25. ДНК-диагностика путем гибридизации меченых зондов (праймеров) с гомологичными участками ДНК. Звездочками отмечены метки (радиоактивная, флуоресцентная или другая) в олигонуклеотидных зондах или праймерах <http://humbio.ru/humbio/genexp/001b27c7.htm>

Уже сейчас на основе достижений программы "Геном человека" и с помощью рекомбинантных ДНК, ПЦР, современных методов анализа ДНК можно многое узнать о строении определенных локусов генома человека. По мере того как генодиагностика становится все более доступной, ее будут

внедрять в практику, а результаты заносить в медицинскую карту, как это делается с другими сведениями о больном, например с результатами измерения АД, сывороточной концентрации холестерина или гемоглобина. Для проведения ДНК-диагностики необходимо провести анализы с целью обнаружения в геноме больного известных или новых мутаций, ассоциированных с развитием мутантного фенотипа в виде симптомов конкретного заболевания.

Со стремительным развитием и удешевлением ДНК-технологий, а также созданием новых банков генетической информации о различных группах населения, возникает опасность ее неправомерного использования, что может привести к различным видам дискриминации. Поэтому для масштабного внедрения новых технологий ДНК-диагностики параллельно необходимо развитие правовых норм, призванных законодательно закрепить требования к проведению генетических экспертиз и использованию генных технологий, соответствующие главным этическим принципам и нормам современной биомедицины.

Генная терапия представляет собой новый метод лечения, основанный на замене гена, ответственного за заболевание, «здоровым» геном. Целью генной терапии является «исправление» деятельности генов, которые вызывают или способствуют развитию конкретных заболеваний или патологических состояний. Генная терапия осуществляется в двух формах: соматическая генная терапия и генная терапия зародышевых клеток. Соматическая генная терапия - это коррекция заболевания путем введения в клетку-мишень функционально-активного гена, в результате приобретенные свойства проявляются на клеточном уровне и не передаются по наследству. Этот вид терапии разрешен во всех странах мира, владеющих этой технологией. Генная терапия зародышевой линии предполагает вмешательство в генетический аппарат эмбриона на различных стадиях его развития. Этот вид генной терапии запрещен к применению и находится на стадии научных исследований и разработок.

До сих пор лечение генетических заболеваний человека проводили путем введения недостающего белкового продукта. Процедура требует многократного повторения, и, как правило, является дорогой и продолжительной процедурой, ведущей к постепенному ослаблению организма. Нужны принципиально новые виды терапии. Сегодня разработаны две основные стратегии генной терапии: *ex vivo* и *in vivo* (Рис. 26).

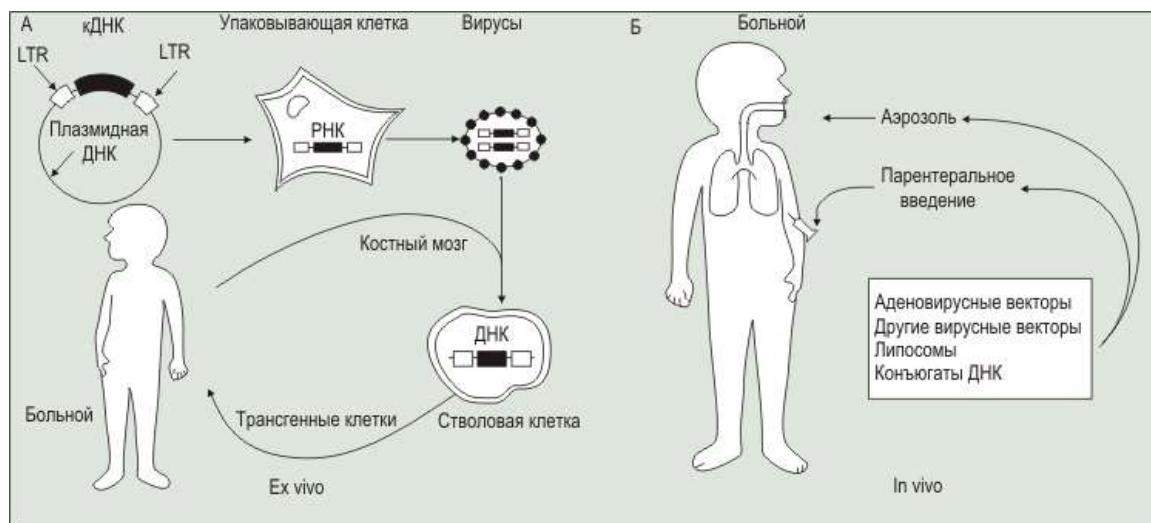


Рис. 26. Основные стратегии генной терапии *ex vivo* и *in vivo* (пояснения в тексте). А - получение *ex vivo* трансгенных стволовых кроветворных клеток с помощью ретровирусного вектора, LTR (long terminal repeat) - длинный концевой повтор вирусного генома. Б - методы *in vivo*: аэрозольная ингаляция при муковисцидозе и парентеральная инъекция для целенаправленной доставки в печень или мышцы генов в составе различных векторов и других систем доставки. <http://www.medbiol.ru/medbiol/>

Генная терапия *ex vivo* (А) включает: получение от пациента клеток с генным дефектом, культивирование изолированных клеток, трансфекция генной терапевтической конструкции в изолированные клетки с помощью ретровирусного вектора, выращивание и отбор трансфицированных клеток, трансплантация (трансфузия) трансфицированных клеток пациенту. Использование собственных клеток пациента гарантирует, что после трансплантации у него не разовьется иммунный ответ. Такой метод применяется при трансплантации клеток костного мозга. Это связано с наличием в нем стволовых клеток, которые способны пролиферировать и

дифференцироваться в различные типы клеток (лимфоциты, макрофаги, эритроциты, тромбоциты и др.).

Генная терапия *in vivo* (Б) представляет собой доставку терапевтического гена непосредственно в клетки. Для доставки применяются *вирусные системы*, прежде всего ретровирусы. Рекомбинантные ретровирусы проникают только в активно делящиеся клетки-мишени и способны включаться в геном клетки-хозяина, из их генома удаляют гены, ответственные за их размножение, однако введенный вектором новый ген передается дочерним клеткам при клеточном делении. Клетки многих тканей, на которые направлена генная терапия, не делятся. В связи с чем, разработаны векторные системы доставки терапевтических генов, учитывая разнообразие потенциальных тканей-мишеней (кожа, мышца, легкие, мозг, толстая кишка, селезенка, печень, клетки крови). Аденовирусы инфицируют неделяющиеся клетки и позволяют вводить гены в клетки нервной системы и эпителий дыхательных путей. Аденовирусы используются также как живые вакцины, предотвращающие респираторные инфекции, гастроэнтериты. Используют афеноассоциированные вирусы, для продуктивной инфекции которых нужны вирусы помощники – аденовирусы. В качестве вектора генов используют вирус герпеса, который способен переносить гены в клетки печени, направленно инфицирует нейроны, существует в них в латентной форме, а литический цикл вирусов инициируется при стрессе. Вирус герпеса подвергается генно-инженерной обработке, ведущей к утрате способности к размножению. Испытываются в качестве векторов ДНК парвовирусы. С помощью вирусных векторов терапевтический ген, кодирующий белок, устраняющий дефект, доставляется в клетки определенной ткани и экспрессируется в них. Экспрессия осуществляется под контролем тканеспецифичного промотора.

Наряду с вирусными применяют *невирусные системы доставки*. Во-первых, это *прямое введение* терапевтической ДНК-конструкции в клетки-мишени. Разработана технология микроинъекций ДНК в клетки (миоциты). Ограничение такого способа доставки заключается в том, что далеко не все

ткани доступны для такой инъекции. Для трансфекции трансгена используют *липосомы*, а именно, создают вокруг терапевтической конструкции искусственную липидную оболочку для облегчения проникновения ее через мембрану. Следующий путь доставки это *конъюгаты ДНК* с трансферрином или асиалогликопротеином, для которых на многих клетках имеются рецепторы (лиганд-рецепторный принцип). После связывания с рецептором конъюганты ДНК поглощаются клеткой, хотя вероятность встраивания введенной ДНК в геном хозяина очень невелика. Все же такой ген может временно выполнять свои функции. Большой потенциал для генной терапии представляют *искусственные хромосомы человека* (НАС-системы экспрессии). Необходимо разработать способы доставки этих векторов в клетки и способы контроля их целевой экспрессии.

В целом, обе стратегии *ex vivo* и *in vivo*, основаны на использовании для терапии генетической конструкции, которая восстанавливает функцию гена. Однако многие заболевания человека связаны с гиперпродукцией генов (онкологические заболевания, воспаления, вирусные инфекции). Возникает необходимость подавить функцию гена, т. е. ингибиовать его экспрессию. Для этой цели разработаны терапевтические системы на основе олигонуклеотидов. Антисмысловой олигонуклеотид может гибридизоваться со специфическим геном или мРНК и снижать уровень транскрипции и трансляции. Олигонуклеотид, который гибридизуется с геном и блокирует транскрипцию называют «антигенным». Олигонуклеотид, который гибридизуется с мРНК – «антисмысловым». Снизить уровень экспрессии может также олигонуклеотид, который связывается с фактором транскрипции.

Перспективным направлением генной терапии при онкозаболеваниях и ВИЧ-инфекции является РНК-интерференция. Способность малых дцРНК подавлять на уровне трансляции экспрессию гомологичных генов является одной из приоритетных областей исследований в современной биомедицине. Эффективным способом доставки малых интерферирующих РНК (si-РНК) в клетки-мишени является использование векторных плазмидных конструкций,

содержащих ДНК, кодирующую si-РНК. При введения векторных конструкций в клетку происходит деградация мРНК-мишени, не образуется соответствующий ей белок, т.е. достигается целевой терапевтический эффект.

Установлено, что в ВИЧ-инфицированных клетках векторные конструкции, экспрессирующие вирусспецифичные si-РНК (соответствуют участкам генов pol, gag и области LTR в вирусном геноме и встроены в плазмидный вектор siSTRIKE™ U6, Hairpin Cloning Systems, Promega), вызывали подавление репродукции ВИЧ-1. Результаты свидетельствуют, что данный подход может быть использован в генной терапии ВИЧ-инфекции.

Терапия, основанная на РНК-интерференции включает:

1. Выбор гена-мишени. Несмотря на то, что эффективность si-РНК проверена в экспериментах на животных, перед внедрением техники РНК-интерференции в противораковую терапию необходима разработка метода на культуре раковых клеток человека. Первым шагом является выбор гена-мишени для РНК-интерференции. Генами-кандидатами могут быть онкогены, антиапоптотические гены, гены ангиогенных факторов, факторов роста или их рецепторов, а также специфические гены, связанные с развитием рака.

2. Создание si-РНК. После выбора гена-мишени с помощью компьютерных программ подбирают si-РНК для подавления целевого гена. Нет единого метода создания идеальной терапевтической последовательности si-РНК. Учитывается несколько параметров исходя из биохимии процесса РНК-интерференции и функций молекулы мРНК. В итоге, синтезируют si-РНК и оценивают уровень гибридизации с мРНК. В настоящее время биотехнологические компании Sigma, Dharmacor, QIAGEN и Ambion занимаются разработкой программного обеспечения для создания si-РНК, а также предоставляют услуги по синтезу специфических si-РНК.

3. Системы доставки si-РНК в клетки. Для доставки si-РНК используют электропорацию, плазмиды, содержащие дцРНК, вирусные вектора, содержащие «касsetы» si-РНК. Плазмидные векторы экспрессируют si-РНК в виде молекул-предшественников. Предшественники содержат дцРНК размером 19-29 пар

нуклеотидов, комплементарные последовательности мРНК-мишени, и шпильку, состоящую из 6-9 нуклеотидов, которая удаляется белком Dicer с образованием молекулы si-РНК. Плазмидные векторы, экспрессирующие такие малые РНК, успешно применены для подавления экспрессии специфических генов. Эффективными системами доставки si-РНК являются вирусные векторы на основе адено- и ретровирусов, которые обеспечивают стабильную и продолжительную экспрессию малых РНК. Для доставки si-РНК в клетки используют также наночастицы. Они характеризуются высокой специфичностью к определенным молекулам РНК и к определенным клеткам, тем самым, исключая связывание с нецелевыми клетками. Разработан метод доставки наночастиц, содержащих специфические последовательности si-РНК, в клетки больных меланомой. Анализ показал, что наночастицы, нагруженные si-РНК, успешно ингибировали экспрессию ключевого опухолевого гена RRM2, контролирующего деление раковых клеток.

К генной терапии также относят генно-инженерные разработки, когда клетки модифицируют, чтобы усилить иммунный ответ организма на нежелательные явления, вызванные инфекцией или возникновением опухолей. Модификация осуществляется введением новой генетической информации в клетки, против которых хотят увеличить иммунный ответ, либо в клетки иммунной системы, с помощью которых хотят усилить этот эффект. В разработке "противоопухолевые вакцины", способные усилить иммунную реакцию организма и представляющие собой опухолевые клетки с дополнительными генами поверхностных антигенов, которые экспонируясь на поверхности опухолевой клетки, усилият ее идентификацию и вызовут иммунный ответ. Также разрабатываются модификации клеток иммунной системы, направленные на уничтожение опасных клеток.

Итак, в настоящее время более 4000 заболеваний человека классифицируют как генетические. Лишь небольшая часть из них картирована. Рецессивные генетические болезни, такие как муковисцидоз и недостаточность аденоциндинэминазы, проявляются, если повреждены оба аллеля гена. В

доминантных аутосомных болезнях, например, болезнь Хантингтона, эффект больного гена проявляется, даже если другой аллель здоров. Наконец, заболевания, сцепленные с Х-хромосомой, проявляются только у мужчин. Генная терапия может применяться для монофакторных и полифакторных заболеваний. Большинство болезней современного общества, такие как рак, атеросклероз, нейропсихиатрические болезни имеют существенный генетический компонент и могут рассматриваться, как объекты классической генной терапии. Но в этих случаях необходимо выяснить механизмы межгенных взаимодействий, включая механизмы экспрессии генов, что непросто.

В целом, к 2012 г. около 400 проектов по генной терапии находятся на различных стадиях клинических испытаний: более 200 из них проходит первую стадию (оценка токсичности), 133 - вторую (испытание на небольшой группе тяжелобольных пациентов) и только 3 проекта (два по лечению рака мозга и один по гемофилии) - на заключительной третьей стадии (масштабные клинические испытания). Пока генная терапия применяется в основном в онкологии (более 60% проектов). Примерно по 15% приходится на генную терапию инфекционных (СПИД, гепатит В, туберкулез) и моногенных заболеваний (муковисцидоз, семейная гиперхолестеринемия, мукополисахаридозы, гемофилия А и др.).

Итоги двадцатилетней практики показали, что генная терапия пока далека от широкого практического использования. Основные успехи достигнуты на моделях. Но человек это не просто большая мышь [Crystal *ea* 1995]. Накапливаются факты, свидетельствующие о негативном опыте. У пациента с муковисцидозом, которому аденоовирусный вектор с кДНК вводили в легкие, возник воспалительный процесс, хотя у мышей не наблюдалось токсичности при 1000 кратно больших дозах. Главной проблемой при лечении опухолей является преодоление барьеров для проникновения терапевтического агента в опухоль с минимальной токсичностью для здоровых клеток. Модели дают очень обещающие результаты, которые не подтверждаются на людях, поскольку их физиология и биохимия сильно различны. 17 сентября 2000 г. в Университете

Пенсильвании умер 17 летний юноша, которого пытались вылечить путем генной терапии от наследственного заболевания печени. Он умер вследствие гиперреакции иммунной системы на ввод в печень генно-инженерного аденоовириуса. Этот факт стал тревожным сигналом для многих медицинских центров, начинаяющих генную терапию, т.к. в 30% случаях для доставки генов используются аденоовириусные вектора. Оказалось, что еще до смерти юноши от инъекций аденоовириусов умирали обезьяны и у добровольцев по аналогичному лечению, получавших более низкие дозы вируса, наблюдалась сильная интоксикация печени. Этот случай заставил пересмотреть все подходы с вирусной доставкой трансгена в организм больного и привел к приостановке применения методов генной терапии. Кроме того, не все из вводимых генов достигают цели, и не все, попавшие в поврежденную клетку, эффективно экспрессируются. Подтверждается проблема использования вируса в качестве переносчика гена. Организм встречает вирус как «чужака», и у некоторых пациентов из-за этого наблюдается тяжелая иммунная реакция.

В целом, генная терапия является принципиально новым перспективным направлением в медицине. За короткое время существования новая дисциплина прошла огромный путь от экспериментальной разработки до практического применения, накоплен огромный объем информации, вложены колоссальные денежные средства. Хотя практические наработки и успехи генной терапии пока скромны, есть основания полагать, что в будущем стремительное развитие протеомных, геномных и информационных технологий помогут достичь серьезных успехов в лечении многих заболеваний человека и приведут к широкому применению этих методов в клинической практике.

В заключении о проблеме клонирования человека, она сложна, многокомпонентна и требует широкой обсуждения во всех слоях общества. Методология клонирования человека пока несовершенна, но это дело времени. В результате генно-инженерными методами будет клонирована биологическая копия индивидуума, клонировать личность человека невозможно. Поэтому нужны строгие законодательные и этико-правовые критерии для проведения

такой процедуры. В связи с чем, эксперименты по клонированию человека и генная инженерия зародышевой линии запрещены во всех европейских государствах и в большинстве высокоразвитых стран.

Основная литература

1. Ленглер Й., Древс Г., Шлегель Г. Современная микробиология. Прокариоты. (В двух томах) // М.: Мир, 2009. -653 с.(1 том), 493 с.(2 том)
2. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия // Новосибирск: Сибирское университетское издание, 2004. - 496 с.
3. Жимулев И.А. Общая и молекулярная генетика // Новосибирск: Сибирское университетское издание, 2004. - 480 с.
4. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. Том 1 и 2 // М.: Мир, 1998. - 766с.
5. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение // М.: Мир, 2002. - 590 с.
6. Brown E. Genomics, 2-th ed. - New York: W.H.Freeman & Co. - 2002. - <http://www.ncbi.nih.gov/book/genomic>
7. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaria P., Baltimore D., Darnell D. Molecular Cell Biology. Eds- 4-th ed. // New York: W.H. Freeman & Co. - 2000. - <http://www.ncbi.nih.gov/book/Molecular Cell Biology/Recombinant DNA and Genomics>
8. Eds. Griffiths A.J.F., Gelbart W.M., Miller J.H., Lewontin R.C. Modern Genetic Analysis // New York: W.H. Freeman & Co. - 1999. - <http://www.ncbi.nih.gov/book/Modern Genetic Analysis/Recombinant DNA technology>
9. Albe, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Molecular Biology of the Cell // New York: 2002 - <http://www.ncbi.nih.gov/book/Molecular Biology of the Cell/Basic Genetic Mechanisms>
10. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // Nature. – 1997. Feb 27;385(6619):810-3.
11. Crystal R.G. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success // Science. – 1995. Oct 20;270(5235):404-10. Review. PMID: 7569994 [PubMed - indexed for MEDLINE]