

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский
технический университет имени К. И. Сатпаева

К. М. Искакова

ОСНОВЫ ДНК-ТЕХНОЛОГИИ

Учебное пособие

Рекомендовано Научно-методическим советом университета
в качестве учебного пособия

Алматы 2017

УДК 575/578 (075,8)

ББК 28.070я73

И 86

Рецензенты:

Курбанова Г. В. – д-р биол. наук, проф.

Жамбакин К. Ж. – д-р биол. наук, проф., член-корр. НАН РК

Жумагельдтнов Б. К. – канд. с-х.н., Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина

Печатается по плану издания Министерства образования и науки Республики Казахстан на 2017 год.

Искакова К. М.

И86 Основы ДНК-технологии: Учеб. пособие / *К. М. Искакова*
– Алматы, КазННТУ имени К. И. Сатпаева, 2017. – 227 с.:
Ил. 23. Библиогр. – 55 назв.

ISBN 978-601-323-055-9

Основная цель данного учебного пособия – помочь студентам углубить и закрепить теоретические знания по предмету, познакомить с современными методами ДНК-технологии. В пособии изложены основы ДНК-технологии: механизмы репликации, репарации; методы клонирования, амплификации и секвенирования ДНК; конструирование рекомбинантных ДНК, а также большое внимание уделено ПЦР-диагностики, методам генной терапии и биотехнологическим методам создания банка генов.

Данное пособие включает двенадцать глав, после каждой главы приведены вопросы для самопроверки усвоенных знаний. В конце подробный глоссарий современных генетических терминов.

Учебно-методическое пособие по основам ДНК-технологии предназначено для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности биотехнология и экология. Учебно-методическое пособие также является ценным для молодых ученых, работающих в области молекулярной биологии и биотехнологии.

ISBN 978-601-323-055-9

© КазННТУ им. К. И. Сатпаева, 2017

© Искакова К. М., 2017

ВВЕДЕНИЕ

Современный этап развития биотехнологии основан на широком использовании ДНК-технологий. Большому прогрессу ДНК-технологий способствовало то, что была осознана их важность и перспективность в решении многих проблем человечества в области экологии, медицины, промышленности и сельского хозяйства. ДНК-технология – новый раздел молекулярной генетики, основная цель которого – исследование и изменение наследственного материала на разных уровнях его организации: геномном, генном, хромосомном и т. д.

Главная задача ДНК-технологии – выделение отдельных генов, их клонирование (размножение) и создание рекомбинантной ДНК. В качестве примеров генной ДНК-технологии *in vitro* можно назвать: транслокацию в вирусные геномы некоторых клеточных генов, придающих вирусам свойства онкогенности: трансдукцию (перенос) клеточных генов клеток-доноров в клетки-реципиенты с помощью фагов, создание молекулярных конструкций из фрагментов ДНК разного происхождения, включение их в реципиентные клетки *E. coli* с последующим культивированием всех организмов для получения белковых продуктов (гормонов, ферментов).

Суть геномной ДНК-технологии заключается в направленной перестройке генома прокариот и эукариот, вплоть до создания новых видов. При геномной ДНК-технологии добиваются внесения большого количества дополнительной генетической информации, в результате чего получают гибридный организм, отличающийся от исходного по многим признакам.

Начало ДНК-технологии было положено в 1972 г., когда П. Берг с сотрудниками выполнили первый генно-инженерный проект – объединили ДНК R-плазмиды (плазмиды множественной устойчивости к лекарствам) с ДНК дрозофилы и

размножили рекомбинант в кишечной палочке. Так, путем объединения фрагментов ДНК, была получена первая рекомбинантная молекула ДНК. Получение рекомбинантных ДНК открыло возможность вникать в хранилище генетической информации – геном, и меняя его определенным образом в пробирке, вводить измененную генетическую информацию обратно в организм, минуя половой путь.

Введение генетической информации в соматические или половые клетки высших организмов стало реальным в 80-х годах XX в., когда была освоена техника выделения генов, их идентификация. Получение трансгенных мышей методом инъекции ДНК в мужской пронуклеус зиготы открыло перспективы для практического перенесения генов (транспозона) для улучшения признаков сельскохозяйственных животных.

Определенные успехи достигнуты с помощью ДНК-технологий при разработке вакцин для человека и животных. С помощью методов генной инженерии были идентифицированы антигены многих инфекционных агентов; клонированы гены, кодирующие соответствующие белки, и в ряде случаев налажено производство вакцин на основе белковых субъединиц этих антигенов. Наглядным примером является производство поверхностного антигена гепатита Б. Вирусный ген был встроен в дрожжевую плазмиду, в результате чего в дрожжах в больших количествах стал синтезироваться белок вируса, который после очистки используется для инъекций в качестве эффективной вакцины против гепатита.

Использование достижений ДНК-технологий идет в основном в следующих направлениях:

- исследование наследственности на генном, геномном и популяционном уровнях;
- конструирование новых организмов путем пересадки чужеродных генов, т. е. получение трансгенных животных.

В данном учебном пособии рассмотрены все основные современные методы и методологии использования ДНК-технологии в фундаментальных и прикладных исследованиях.

1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ ДНК-ТЕХНОЛОГИИ

ДНК-технологии сегодня – одна из ключевых высоких технологий. По стоимости своей продукции она уже сегодня сравнима с такими мощными отраслями, как машиностроение, химия, электроника. По прогнозам, в XXI в. полученные с ее помощью продукты составят не менее 20 % всех товаров, поступающих на мировой рынок. В развитых и динамично развивающихся странах ДНК-технологии относят (в зависимости от страны) к первому, второму, третьему из приоритетных направлений. Она включена во все программные документы, посвященные стратегии развития, публикуемые ООН, ЕС, правительствами отдельных государств. Количество публикаций по вопросам, связанным с ДНК-технологией, в мире огромно.

Парадигма ДНК-технологии определяется глобальными социальными задачами. Основные цели ее развития – решить проблему голода, создать эффективные средства лечения людей и защиты окружающей среды, предложить альтернативные экологически чистые технологии с низкой энергоемкостью и высокой степенью утилизации сырья в сельском хозяйстве, металлургии, энергетике и других отраслях. Многие считают, что единственный выход сейчас, в связи с глобальным загрязнением, потеплением и т. д. – переход к биологическому этапу развития цивилизации. В связи с этим нужно выработать новую парадигму существования и новый стиль мышления. В общем, это новый этап эволюции старой цивилизации. Необходима новая биологическая культура, а, следовательно, широкое биологическое и экологическое образование людей.

1.1. Возникновение, становление и развитие ДНК-технологий. Полимеразно-цепная реакция – как метод исследования ДНК

В результате открытия в 1953 г. Д. Уотсоном и Ф. Криком структуры ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) – носителя

наследственной информации живых существ, описания комплементарности ее организации, стал понятен и объясним принцип генетики наследственности, что явилось основой новой области науки и технологии – ДНК-технологии. В общем, все методы ДНК-технологии, связанные с созданием новых генных конструкций и на их основе новых организмов, основаны на искусственном воспроизведении процессов, реально существующих в живой природе. Исследователи, по сути, не придумывая ничего нового, лишь используют приемы многократно реализованных в процессе эволюции живых организмов – изменчивость, наследственность и отбор.

Настоящий переворот в молекулярной генетике произошел с момента открытия в 1986 г. Кери Мюллисом в соавторстве, удостоившегося Нобелевской премии, метода полимеразной цепной реакции – ПЦР (polymerize chain reaction- PCR). В основе метода ПЦР лежит способность ДНК-полимераз, осуществлять направленный синтез второй, т. е. комплементарной цепи ДНК, по имеющейся матрице одноцепочной ДНК, наращивая небольшую олигонуклеотидную затравку (праймер), комплементарную участку этой матрицы, до размеров в несколько тысяч или даже десятков тысяч звеньев. Собственно как метод ПЦР возник когда стали использовать не просто ДНК- полимеразу, а так называемую термостабильную, которая была выделена из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* (Taq), обитающей в горячих источниках, а позднее и биомассы действующих вулканов. Температурный оптимум работы фермента находится в области 70–72 °С.

Каждый цикл ПЦР состоит из трех этапов:

- на первом этапе необходимо денатурировать ДНК, для чего реакционную смесь нагревают до 92–95 °С, в результате двуцепочные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочных молекул;

- на втором этапе происходит отжиг (присоединение праймеров к ДНК-мишени с образованием коротких двухцепочных участков ДНК, необходимых для инициации синтеза). С образовавшимися комплексами праймер-матрица связывается ДНК-полимераза;

- на третьем этапе происходит одновременное копирование ДНК с двух праймеров, комплементарных участкам ДНК на противоположных цепях.

Двунитевые фрагменты ДНК, равные по длине расстоянию между двумя праймерами, начинают накапливаться после третьего цикла. Важно, что синтезированные в ходе первого цикла ПЦР цепи ДНК также служат матрицами для второго цикла амплификации. Таким образом, происходит накопление ампликонов в реакционном растворе, теоретически в геометрической прогрессии.

Даже если в исходном растворе первоначально находилась только одна двухцепочная молекула ДНК, то за 30–40 циклов синтезируется столько молекул ампликона, что их концентрация достигает 10–20 мкг/мл. Этого количества достаточно для достоверного визуального обнаружения продукта ПЦР методом электрофореза в агарном или полиакриламидном геле.

Полимеразная цепная реакция в настоящее время является наиболее совершенным диагностическим методом молекулярной биологии и широко применяемым в ДНК-технологиях.

1.2. Практическое использование ДНК-технологий

Использование рекомбинантных (перестроенных) ДНК различного происхождения составляет основу ДНК-технологий. Теоретически все 30–40 тысяч структурных генов человека и других организмов доступны экспериментальному анализу. Поэтому желательна идентификация всех генов; установление карты тканеспецифичности их экспрессии; идентификация регуляторных областей генов; построение глобальной регуляторной карты генома; классификации генов по структурным и биохимическим функциям их продуктов; идентификация всех потенциальных белков и доменов; анализ распределения полиморфизма и мутаций; определение эволюционных и популяционных взаимосвязей; создание коллекции генетического материала и т. д.

Кроме понимания фундаментальных молекулярных процессов, лежащих в основе жизни, определение нуклеотидной

последовательности геномов имеет и практическое применение. Например, определение того, какие именно метаболические пути и шунты имеются у патогенных бактерий, может помочь в выборе антибиотиков для целевого воздействия именно на данного возбудителя, не затрагивающего нормальную микрофлору. Выявление новых метаболических путей может помочь созданию новых антибиотиков.

В результате таких исследований можно ожидать развития новой медицины и ее новых подразделов, таких как геномная терапия; фармакогеномика; лекарства нового поколения – эндогенные биорегуляторы, ДНК-вакцины. Развиваются новые методы диагностики предрасположенности к болезням, новые технологии экспресс-диагностики вновь появляющихся инфекций, а также использование новых технологий для развития производства пищевых продуктов, для контроля и улучшения экологических ситуаций. Эти исследования будут способствовать развитию новых подходов (и) в сельском хозяйстве – к диагностике болезней, идентификации генетических признаков, пород животных и сортов растений для селекции, с новыми и улучшенными свойствами на основе направленного изменения геномов.

Используя самые последние достижения фундаментальных биологических наук, в т. ч. и ДНК-технологий, можно добиваться увеличения эффективности разведения животных. Хозяйственно-полезные признаки животных, такие как: удойность, состав молока, качество туш и мяса, плодовитость, сопротивляемость или чувствительность к инфекциям, в большинстве своем, являются полигенными признаками, результатом взаимодействия многих генов. В результате взаимодействия с ДНК-технологиями появилось новое направление – MAS-селекция (marker assistant selection, селекция с помощью маркеров). Это позволяет вести селекцию на качественно новом уровне, в меньшей зависимости от факторов окружающей среды. Введение в широких масштабах искусственного оплодотворения скота создало условия для передачи хозяйственно-ценных генов, в частности, обуславливающих высокую молочную продуктивность.

Технология суперовуляции и трансплантации эмбрионов (МОЕТ – multiple ovulation and embryo transfer) резко увеличивает возможности получения многочисленного потомства от животного с выдающимися характеристиками продуктивности, и соответственно, получение животных с определенными, полезными для селекции генами. Однако, сама эта технология не решает проблем поиска таких генов. Идентификация генов, которые определяют то или иное развитие количественных признаков (главные гены количественных признаков – QTL – Quantitative Trait Loci), а также их мутаций, поиск молекулярно-генетических маркеров, тесно сцепленных с ними, являются в настоящее время предметом интенсивных исследований с использованием ДНК-технологий.

Генетическая инженерия. Современная биология и биохимия интенсивно используют методы, основанные на рекомбинантной ДНК. Рекомбинантная ДНК – искусственно созданная человеком последовательность ДНК, части которой могут быть синтезированы химическим путём, с помощью ПЦР (полимеразная цепная реакция) или клонированы из ДНК различных организмов. Рекомбинантные ДНК могут быть трансформированы в клетки живых организмов в составе плазмид или вирусных векторов. Генетически модифицированные животные и растения обычно содержат рекомбинантные гены, встроенные в их хромосомы. В то время как генетически модифицированные бактерии и дрожжи используются для производства рекомбинантных белков, животные используются в медицинских исследованиях, а растения с улучшенными пищевыми качествами – в сельском хозяйстве.

Судебно-медицинская экспертиза. Судмедэксперты используют ДНК в крови, сперме, коже, слюне или волосах, обнаруженных на месте преступления для обнаружения преступника. Процесс идентификации называется генетическим фотерпринтингом (более точно, определением профиля ДНК). В фотерпринтинге сравниваются вариабельные ДНК генома, например, короткие тандемные повторы и минисателлитные последовательности разных людей. Это очень надёжный метод определения преступников, хотя определение

может быть затруднено при загрязнении сцены преступления ДНК других людей. В настоящее время во многих западных странах, например, Великобритании у преступников, обвинённых в преступлениях некоторых типов, забирается образец ДНК для базы данных. Это помогло обнаружить виновных в ранее нераскрытых преступлениях, поскольку ДНК сохраняется на вещественных доказательствах. Ещё этот метод используется для определения личности в случае массовой гибели людей.

С 1 января 2009 г. в России принимается федеральный закон «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации». Геномная регистрация объявляется обязательной процедурой для определённых групп лиц (заключённые и бывшие заключённые, неустановленные лица), а также добровольной для остальных граждан. Этот закон поможет сократить количество преступлений, а также будет являться доказательством в судебных разбирательствах при решении вопросов наследования, назначении алиментов. Добровольный анализ ДНК используется при установлении отцовства/материнства, с целью получения прав родственника, или прав наследника при наследовании имущества, а также при определении генетической предрасположенности к заболеваниям или пагубной зависимости.

Биоинформатика. Биоинформатика включает в себя обработку данных (data mining), содержащихся в последовательности ДНК. Развитие компьютерных методов для сохранения и поиска такой информации привели к развитию применяемых и в других областях направлений информатики, как SSA (string searching algorithm), машинное обучение и базы данных. Алгоритмы типа SSA, которые ищут определённую последовательность букв в большей последовательности букв, были разработаны для поиска специфических последовательностей нуклеотидов. В других компьютерных приложениях, например, текстовых редакторах самые простые алгоритмы справляются с этой задачей, но последовательности ДНК относятся к наиболее трудно обрабатываемым, потому что они состоят всего из четырёх букв. Сходная проблема возникает при сравнении последовательностей из разных организмов (sequence

alignment), которое используется в изучении филогенетических взаимоотношений между этими организмами и функций белков. Данные, представляющие собой последовательность целых геномов, одним из наиболее сложным из которых является геном человека, трудно использовать без описания, которое указывает на положение генов и регуляторных последовательностей на каждой хромосоме. Участки ДНК, последовательности которых содержат последовательности, ассоциированные с генами, кодирующими белки или РНК, могут быть найдены с помощью специальных алгоритмов, которые позволяют предсказать наличие продуктов экспрессии генов до их выявления в результате экспериментов

ДНК и компьютеры нового поколения. ДНК впервые была использована в вычислительной технике для решения «проблемы пути Гамильтона» (en:Hamiltonian path problem), частного случая NP-полной задачи. ДНК-компьютер имеет преимущества относительно электронных компьютеров, поскольку теоретически требует меньше электричества, занимает меньше места и более эффективен из-за возможности одновременных подсчётов, задача выполнимости формулы и вариант задачи были проанализированы с помощью ДНК-компьютеров. Из-за компактности ДНК она теоретически может найти применение в криптографии, где она может использоваться для конструирования одноразовых шифроблокнотов.

История и антропология. Поскольку с течением времени в ДНК накапливаются мутации, которые затем передаются по наследству, она содержит историческую информацию, поэтому генетики могут предположить эволюционную историю организмов (филогенетика). Филогенетика – метод эволюционной биологии. Если сравниваются последовательности ДНК внутри вида, эволюционные генетики могут узнать историю отдельных популяций. Эта информация может быть полезна в разных областях науки, начиная с экологической генетики и заканчивая антропологией. ДНК используется для определения отцовства и родственных взаимоотношений, например, было доказано, что третий президент США Томас

Джефферсон был отцом ребёнка рабыни Салли Хемингс. В России останки семьи последнего царя Российской империи Николая II были также идентифицированы с помощью образцов ДНК, взятых у ныне живущих родственников царя. Используемый в таких случаях метод похож на тот, который применяют в криминалистике, иногда доказательством виновности являются общие специфические характеристики ДНК, обнаруженные на сцене преступления и ДНК родственников преступника.

ДНК музыка. Используя нуклеотидную последовательность ДНК, можно написать музыкальную композицию. Теоретических предпосылок для осуществления перевода нуклеотидной последовательности в звуковой ряд – несколько. Первая – это то, что последовательность ДНК подпадает под понятие розовый шум, это значит – ДНК можно рассматривать как источник музыки. Вторая предпосылка – это возможность построить на основе последовательности ДНК фрактал, это соответствует принципам повторяемости звуков в музыке. Третья предпосылка – это возможность итерации определённых физических характеристик нуклеотидов в слышимую область. Родоначальником ДНК музыки можно по праву считать американского биолога Дэвида Димера (David Deamer), который первым разработал алгоритм написания ДНК музыки на основе характеристики поглощения нуклеотидами света в инфракрасном спектре. На сегодняшний день ДНК музыкой профессионально занимаются несколько коллективов и композиторов, среди них – трио HUGO, композиторы Сьюзен Александер (Susan Alexjander), Стюарт Митчелл (Stuart Mitchell) и Тодд Бартон (Todd Barton).

1.3. Основные направления использования ДНК-технологий

Одним из перспективных направлений ДНК-технологий растений является создание растений-биореакторов, способных продуцировать белки, необходимые в медицине, фармакологии и др. К достоинствам растений-биореакторов относится

отсутствие необходимости в кормлении и содержании, относительная простота создания и размножения, высокая продуктивность. Кроме того, чужеродные белки не вызывают иммунных реакций у растений, чего трудно добиться у животных.

Существует потребность в получении целого набора биологически активных белков, которые из-за очень низкого уровня синтеза в специфических тканях или продуктах, недоступны для изучения по механизму действия, широкого использования или определения областей дополнительного применения. К таким белкам относится, например, лактоферрин, который находится в небольшом количестве в молоке млекопитающих, лейкоцитах крови.

Лактоферрин человека (hLF) перспективно использовать в качестве пищевой добавки и лечебного препарата для профилактики и лечения инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта детей раннего возраста, повышения иммунного ответа организма при злокачественных и ряде вирусных (СПИД) заболеваний. Получение лактоферрина из молока крупного рогатого скота, вследствие его низкого содержания, приводит к высокой стоимости препарата. При введении кДНК гена лактоферрина в клетки табака получен ряд каллусных тканей, синтезирующих укороченный лактоферрин, антибактериальные свойства которого были значительно сильнее антибактериальных свойств нативного лактоферрина. Концентрация этого укороченного лактоферрина в клетках табака составляла 0,6–2,5 %.

В геном растений встраиваются гены, продукты которых индуцируют у человека и животных иммунный ответ, например, на оболочечные белки возбудителей различных заболеваний, в частности, холеры, гепатита, диареи, а также на антигены плазматических мембран некоторых опухолей.

Создаются трансгенные растения, несущие гены, продуцирующие некоторые гормоны, необходимые для гормонотерапии людей и т. д.

Примером использования растений для создания вакцин являются работы, выполненные в Стенфордском университете.

В работе были получены антитела для одной из форм рака с помощью модернизированного вируса табачной мозаики, в который был встроен гипервариабельный участок иммуноглобулина лимфомы. Растения, зараженные модернизированным вирусом, продуцировали антитела правильной конформации в достаточном для клинического применения количестве. 80 % мышей, получавших антитела, пережили лимфому, в то время как все мыши, не получавшие вакцины, погибли. Предложенный метод позволяет быстро получать специфичные для пациента антитела в достаточном для клинического применения количестве.

Велики перспективы использования растений для производства антител. Кевин Узил с сотрудниками показал, что антитела, продуцируемые соей, эффективно защищали мышей от инфекции вирусом герпеса. В сравнении с антителами, продуцируемыми в культурах клеток млекопитающих, антитела, продуцируемые растениями, имели сходные физические свойства, оставались стабильными в человеческих клетках и не имели отличий в способности связывать и нейтрализовать вирус. Клинические испытания показали, что использование антител, продуцируемых табаком, эффективно препятствовало размножению мутантных стрептококков, вызывающих кариес.

Было проведено создание вакцины, продуцируемой картофелем, против инсулинозависимого диабета. В клубнях картофеля накапливался химерный белок, состоящий из субъединицы В, токсина холеры и проинсулина. Наличие субъединицы В облегчает потребление данного продукта клетками, что делает вакцину в 100 раз более эффективной.

1.4. Современные инновационные проекты ДНК-технологий в животноводстве

Одним из основных направлений ДНК-технологий в области животноводства, имеющее практическое значение, является создание трансгенных животных, т. е. животных в геном которых «встроен» чужеродный ген.

Получение даже одного животного с унаследованным, пересаженным геном считается большим достижением. Такое животное рассматривают как основу для создания новой линии.

В настоящее время созданы, так называемые, «фармакологические» животные, а именно:

- генетически модифицированные козы, в молоке которых содержится вещество (активатор тканевого плазминогена), способствующее растворению тромбов; экспериментальное средство для лечения рака;

- трансгенные овцы, которые продуцируют химозин в молочной железе. В ближайшей перспективе эта технология может быть реализована в практике, и сыродельная промышленность получит экологически чистый, эффективный и дешевый фермент, который необходим при производстве сыров и лекарств для лечения нарушений пищеварения;

- генетически модифицированные коровы и козы, производящие молоко, содержащее белок человеческого молока – лактоферрин, обладающий антибактериальными свойствами. Молоко может использоваться для лечения иммунодефицитов, а также вводится в состав детских смесей.

Одно из направлений связано с интеграцией чужеродных генов, продуцирующих биологические регуляторы обмена веществ. Получен ряд сельскохозяйственных животных с интегрированным геном гормона роста-регулятора, связанного с активацией анаболизма белка и ингибированием процессов липогенеза. В частности, свиньи с интегрированным геном рилизинг-фактора гормона роста характеризуются повышенными темпами роста в более поздних стадиях развития и большим содержанием белка в туше. Получены трансгенные рыбы с интегрированным геном гормона роста КРС, которые характеризуются более интенсивным ростом, перепелки с интегрированным этим геном характеризуются большим весом яиц.

Другим направлением генно-инженерной селекции является создание трансгенных животных, генетически устойчивых к ряду инфекционных заболеваний. Это достигается путем выделения генов у животных, которые обеспечивают невосприимчивость к определенным инфекциям и интеграция

их в геном других животных. Примером может служить M_x ген мышей, который обеспечивает невосприимчивость к гриппу. Такие работы проводятся и в России – получены свиньи с интегрированным M_x геном, изучается их фенотип. Начаты исследования по получению трансгенной птицы, устойчивой к вирусу гриппа.

Развивается еще одно интересное направление в генной инженерии сельскохозяйственных животных. Это – получение животных, так называемых фенотрансгенов, у которых трансгенными являются клетки определенных органов и тканей. Особый интерес в этом отношении представляют секреторные клетки молочной железы. В настоящее время уже получены коровы, свиньи, секреты клетки молочных желез, которые производят эритропоэтин и интерферон. Это направление будет иметь значение и для развития методов генотерапии животных и человека.

Современные инновационные проекты ДНК-технологий в животноводстве:

- генетическое картирование для отбора высокопродуктивных особей и включения их в селекционные программы (в США и других развитых странах животные отбираются по 4 тыс. ДНК-маркерам);

- создание генетически модифицированных коров, овец и свиней с пониженным содержанием жира и повышенным содержанием постного мяса;

- получение большего количества овечьей шерсти за счет скормливания овцам генетически модифицированного люпина;

- получение генетически модифицированной люцерны, стимулирующей специфический иммунитет у свиней к опасной кишечной инфекции;

- получение вакцины, которая могла бы послужить альтернативой кастрации скота (обеспечить стерилизацию животных без хирургического вмешательства, не оказывая при этом негативного влияния на их рост);

- получение трансгенной птицы, устойчивой к птичьему гриппу.

Одним из важных направлений ДНК-технологий является картирование геномов сельскохозяйственных животных.

С 1990-х годов 17 лабораториями из 9 стран реализуется программа картирования генома свиньи (Пиг Меп), несколько позже запущена аналогичная программа по геному крупного рогатого скота, в ее участии принимает 30 лабораторий из 13 государств. В США финансируется национальный проект по картированию геномов КРС, свиньи, овцы, курицы. Новая Зеландия активно разрабатывает программу по картированию генома овцы.

К главным задачам картирования относятся:

- изучение положения локуса гена на конкретной хромосоме;
- определение генетического расстояния между генами, расположенными на одной хромосоме;
- выявление полиморфизм генов, т. е. всех аллельных вариантов;
- определение нуклеотидной последовательности генов, распределения в них интронов и экзонов, а также межгенетических последовательностей.

Развитие направления по картированию связано с усовершенствованием методов гибридизации *in situ* ДНК с мечеными флуоресцентными красителями зондами.

Методика включает:

- клонирование ДНК-зонда известной последовательности и его мечение;
- денатурация на препарате метафазных хромосом зонда и самих хромосом;
- непосредственно их гибридизация и фиксирование на препарате меченой метки зонда;
- инедтификация хромосомы.

В последнее время для картирования структурных генов или анонимных последовательностей небольшой длины до нескольких сот пар нуклеотидов стали применять метод ПЦР с использованием меченых нуклеотидов.

Основопологающей проблемой повышения эффективности селекционного процесса является изучение детерминант

формирования высокой продуктивности и использования молекулярно-генетических маркеров в генетическом мониторинге и управлении селекционным процессом.

Разработка этой проблемы предусматривает решение задач по установлению связи локусов генома сельскохозяйственных животных с хозяйственно-ценными признаками и отбору значимых для селекционных целей маркеров высокой продуктивности MAS (Marker Assisted Selection).

Многие фенотипические признаки, к которым относятся количественные признаки (QTL – quantity trade loci) сельскохозяйственных животных, является результатом интегрального взаимодействия многих генов. Поэтому при поиске хозяйственно-полезных признаков продуктивности, наиболее информативным является подход позиционного картирования, позволяющий одновременно оценивать состояние многих элементов генома, представленных на всех хромосомах.

Таким образом, современные ДНК-технологии в животноводстве, включают:

- создание новых форм организмов в целях получения животных-продуцентов терапевтически важных для человека белков;
- селекцию с помощью молекулярно-генетических маркеров MAS, предусматривающую картирование, маркирование главных количественных признаков – QTL;
- сохранение биоразнообразия с использованием молекулярно-генетических маркеров;
- разработку генетически обоснованных программ разведения и подбора родительских форм;
- молекулярно-генетический скрининг наследственных заболеваний сельскохозяйственных животных.

1.5. Биокомпьютерные технологии

Применение в вычислительной технике биологических материалов позволит со временем уменьшить компьютеры до размеров живой клетки. Пока это чашка Петри, наполненная спиралями ДНК, или нейроны, взятые у пиявки и

подсоединенные к электрическим проводам. По существу, наши собственные клетки – это не что иное, как биомашинны молекулярного размера, а примером биокомпьютера, конечно, служит наш мозг.

В настоящее время, когда каждый новый шаг в совершенствовании полупроводниковых технологий дается все большим трудом, ученые ищут альтернативные возможности развития вычислительных систем. Естественный интерес ряда исследовательских групп (среди них Оксфордский и Техасский университеты, Массачусетский технологический институт, лаборатории Беркли, Сандия и Рокфеллера) вызвали природные способы хранения и обработки информации в биологических системах. Итогом их изысканий явился (или, точнее, еще только должен явиться) гибрид информационных и молекулярных технологий и биохимии – биокомпьютер. Идут разработки нескольких типов биокомпьютеров, которые базируются на разных биологических процессах. Это, в первую очередь, находящиеся в стадии разработки ДНК- и клеточные биокомпьютеры.

1.5.1. ДНК-компьютеры

Ученые решили попытаться по примеру природы использовать молекулы ДНК для хранения и обработки данных в биокомпьютерах.

Первым из них был Леонард Эдлмен из Университета Южной Калифорнии, сумевший решить задачу гамильтонова пути. Суть ее в том, чтобы найти маршрут движения с заданными точками старта и финиша между несколькими городами, в каждом из которых разрешается побывать только один раз. “Дорожная сеть” представляет собой однонаправленный граф. Эта задача решается прямым перебором, однако при увеличении числа городов сложность ее возрастает экспоненциально. Каждый город Эдлмен идентифицировал уникальной последовательностью из 20 нуклеотидов. Тогда путь между любыми двумя городами будет состоять из второй половины кодирующей последовательности

для точки старта и первой половины кодирующей последовательности для точки финиша (молекула ДНК, как и вектор, имеет направление). Синтезировать такие последовательности современная молекулярная аппаратура позволяет очень быстро. В итоге последовательность ДНК с решением составит 140 нуклеотидов (7×20).

Остается только синтезировать и выделить такую молекулу ДНК. Для этого в пробирку помещается около 100 триллионов молекул ДНК, содержащих все возможные 20-нуклеотидные последовательности, кодирующие города и пути между ними. Далее за счет взаимного притяжения нуклеотидов А-Т и Г-С отдельные цепочки ДНК сцепляются друг с другом случайным образом, а специальный фермент лигаза сшивает образующиеся короткие молекулы в более крупные образования. При этом синтезируются молекулы ДНК, воспроизводящие все возможные маршруты между городами. Нужно лишь выделить из них те, что соответствуют искомому решению.

Эдмэн решил эту задачу биохимическими методами, последовательно удалив сначала цепочки, которые не начинались с первого города — точки старта — и не заканчивались местом финиша, затем те, что содержали более семи городов или не содержали хотя бы один. Легко понять, что любая из оставшихся после такого отбора молекула ДНК представляет собой решение задачи.

Вслед за работой Эдмэна последовали другие. Ллойд Смит из Университета Висконсин решил с помощью ДНК задачу доставки четырех сортов пиццы по четырем адресам, которая подразумевала 16 вариантов ответа. Ученые из Принстонского университета решили комбинаторную шахматную задачу: при помощи РНК нашли правильный ход шахматного коня на доске из девяти клеток (всего их 512 вариантов).

Ричард Липтон из Принстона первым показал, как, используя ДНК, кодировать двоичные числа и решать проблему удовлетворения логического выражения. Суть ее в том, что, имея некоторое логическое выражение, включающее n логических переменных, нужно найти все комбинации значений

переменных, делающих выражение истинным. Задачу можно решить только перебором 2^n комбинаций. Все эти комбинации легко закодировать с помощью ДНК, а дальше действовать по методике Эдлмена. Липтон предложил также способ взлома шифра DES (американский криптографический), трактуемого как своеобразное логическое выражение. Первую модель биокомпьютера, правда, в виде механизма из пластмассы, в 1999 г. создал Ихуд Шапиро из Вейцмановского института естественных наук. Она имитировала работу “молекулярной машины” в живой клетке, собирающей белковые молекулы по информации с ДНК, используя РНК в качестве посредника между ДНК и белком.

А в 2001 г. Шапиро удалось реализовать модель в реальном биокомпьютере, который состоял из молекул ДНК, РНК и специальных ферментов. Молекулы фермента выполняли роль аппаратного, а молекулы ДНК – программного обеспечения. При этом в одной пробирке помещалось около триллиона элементарных вычислительных модулей. В результате скорость вычислений могла достигать миллиарда операций в секунду, а точность – 99,8 %.

Пока биокомпьютер Шапиро может применяться лишь для решения самых простых задач, выдавая всего два типа ответов: “истина” или “ложь”. В проведенных экспериментах за один цикл все молекулы ДНК параллельно решали единственную задачу. Однако потенциально они могут трудиться одновременно над разными задачами, в то время как традиционные ПК являются, по сути, однозадачными.

В конце февраля 2002 г. появилось сообщение, что фирма Olympus Optical претендует на первенство в создании коммерческой версии ДНК-компьютера, предназначенного для генетического анализа. Машина была создана в сотрудничестве с доцентом Токийского университета Акирой Тояма.

Компьютер, построенный Olympus Optical, имеет молекулярную и электронную составляющие. Первая осуществляет химические реакции между молекулами ДНК, обеспечивает поиск и выделение результата вычислений. Вторая – обрабатывает информацию и анализирует полученные результаты.

Анализ генов обычно выполняется вручную и требует много времени: при этом формируются многочисленные фрагменты ДНК и контролируется ход химических реакций. “Когда ДНК-компьютинг будет использоваться для генетического анализа, задачи, которые ранее выполнялись в течение трех дней, можно будет решать за шесть часов”, – сказал сотрудник Olympus Optical Сатоши Икута.

В компании надеются поставить технологию генетического анализа на основе ДНК-компьютера на коммерческую основу. Ученые планируют внедрять молекулярные наноустройства в тело человека для мониторинга состояния его здоровья и синтеза необходимых лекарств.

1.5.2. Клеточные компьютеры

Еще одним интересным направлением является создание клеточных компьютеров. Для этой цели идеально подошли бы бактерии, если бы в их геном удалось включить некую логическую схему, которая могла бы активизироваться в присутствии определенного вещества. Такие компьютеры очень дешевы в производстве. Им не нужна столь стерильная атмосфера, как при производстве полупроводников. И единожды запрограммировав клетку, можно легко и быстро вырастить тысячи клеток с такой же программой.

В 2001 г. американские ученые создали трансгенные микроорганизмы (т. е. микроорганизмы с искусственно измененными генами), клетки которых могут выполнять логические операции И и ИЛИ.

Специалисты лаборатории Оук-Ридж, штата Теннесси, использовали способность генов синтезировать тот или иной белок под воздействием определенной группы химических раздражителей. Ученые изменили генетический код бактерий *Pseudomonas putida* таким образом, что их клетки обрели способность выполнять простые логические операции. Например, при выполнении операции в клетку подаются два вещества, под влиянием которых ген вырабатывает определенный белок. Теперь ученые пытаются создать на базе

этих клеток более сложные логические элементы, а также подумывают о возможности создания клетки, выполняющей параллельно несколько логических операций.

Потенциал биокомпьютеров очень велик. По сравнению с обычными вычислительными устройствами они имеют ряд уникальных особенностей. Во-первых, они используют не бинарный, а тернарный код (т. к. информация в них кодируется тройками нуклеотидов). Во-вторых, поскольку вычисления производятся путем одновременного вступления в реакцию триллионов молекул ДНК, они могут выполнять до 10^{14} операций в секунду (правда извлечение результатов вычислений предусматривает несколько этапов очень тщательного биохимического анализа и осуществляется гораздо медленнее). В-третьих, вычислительные устройства на основе ДНК хранят данные с плотностью, в триллионы раз превышающей показатели оптических дисков. И наконец, ДНК-компьютеры имеют исключительно низкое энергопотребление.

Однако в разработке биокомпьютеров ученые столкнулись с целым рядом серьезных проблем. Первая связана со считыванием результата – современные способы секвенирования (определения кодирующей последовательности) не совершенны: нельзя за один раз секвенировать цепочки длиной хотя бы в несколько тысяч оснований. Кроме того, это весьма дорогостоящая, сложная и трудоемкая операция.

Вторая проблема – ошибки в вычислениях. Для биологов точность в 1 % при синтезе и секвенировании оснований считается очень хорошей. Для ИТ она неприемлема: решения задачи могут потеряться, когда молекулы просто прилипают к стенкам сосудов; нет гарантии, что не возникнут точечные мутации в ДНК, и т. п. И еще – ДНК с течением времени распадаются, и результаты вычислений исчезают на глазах! А клеточные компьютеры работают медленно, и их легко “сбить с толку”. Со всеми этими проблемами ученые активно борются.

Биокомпьютеры не рассчитаны на широкие массы пользователей. Но ученые надеются, что они найдут свое место в медицине и фармации. Глава израильской исследовательской группы профессор Эхуд Шапиро уверен, что в перспективе

ДНК-наномашины смогут взаимодействовать с клетками человека, осуществлять наблюдение за потенциальными болезнетворными изменениями и синтезировать лекарства для борьбы с ними.

Наконец, с помощью клеточных компьютеров станет возможным объединение информационных биотехнологий. Например, они смогут управлять химическим заводом, регулировать биологические процессы внутри человеческого организма, производить гормоны и лекарственные вещества и доставлять к определенному органу необходимую дозу лекарств.

Какие же задачи можно решать, используя биокомпьютер? Если ввести в биокомпьютер фамилию, имя и отчество человека, то можно получить информацию о его предназначении, способностях, дарах Божьих – феноменах, о которых он даже не подозревает, выявить успешность работы в данной фирме, совместимость с командой фирмы, и таких показателей может быть 50–80.

Затем можно получить полную информацию о состоянии здоровья каждого элемента его организма, отклонения не от средней нормы, а от нормы данного человека в процентах и узнать причину этих отклонений. Клиент может сделать заказ пользователю биокомпьютера по телефону, факсу из любой точки земного шара и таким же способом получить распечатанный ответ.

Если ввести в биокомпьютер только название фирмы и фамилию, имя, отчество директора, то можно получить данные о факторах, влияющих на экономику предприятия, данные о конкурентоспособности его продукции на любых рынках, объёмы реализации продукции в будущих периодах, эффективность инвестиций в новые направления, эффективность сотрудничества или слияния с другими фирмами, эффективные и целесообразные объёмы рекламы и тому подобные данные.

В спорте, искусстве, шоу-бизнесе по фамилии, имени и отчеству можно получить полную информацию об успехе, возможностях, совместимости с коллективом приобретаемого

кандидата в клуб или коллектив. Фактически уже открыто новое направление – геология интеллектуальных ресурсов стран, и это самое главное их богатство.

Для крупных объединений, корпораций только с помощью биокомпьютерных технологий можно разработать прогнозы их развития, выявить новые направления деятельности с учетом будущих реалий нашего мира.

Биокомпьютерные технологии привлекательны тем, что практически все задачи решаются оперативно. Обследование эффективности деятельности огромного судостроительного завода, включая экономику, парк оборудования, состояние производственных площадей, конкурентоспособность основных видов продукции, выявление производств, требующих расширения, реконструкции и технического перевооружения, было выполнено за три дня.

Анализ и прогноз деятельности крупного банка и 30 его филиалов был выполнен за десять дней. Очень важным обстоятельством при выполнении подобных работ является то, что биокомпьютерные технологии не требуют исходной статистической и тем более коммерчески закрытой информации.

Для решения научных проблем биокомпьютер заменит все технические средства научных проблемных лабораторий, оставив им решать незначительные прикладные задачи.

Биокомпьютерные технологии в бизнесе, науке, в высоких властных структурах позволяет совершить переворот в эффективности управления, освободить руководителей от состояния неуверенности, когда будущее в тумане, оно "кажется" и позволяет руководителям "ясно" видеть будущее, во многом отказаться от сбора рутинной статистики.

Пока компьютеры из ДНК несовершенны и работают только в лабораториях, однако ученые полагают, что такие устройства перспективны для использования внутри человеческого тела. Например, они могут оценивать концентрацию в крови того или иного вещества, и на основании полученного результата регулировать выделение лекарства, содержащегося в капсулах-переносчиках.

Вопросы для самоконтроля:

1. Развитие ДНК-технологии.
2. Кратко охарактеризуйте практическое использование ДНК-технологий.
3. Опишите использование лактоферрина человека в ДНК-технологии.
4. Какие существуют инновационные проекты ДНК-технологий в животноводстве?
5. Перечислите главные задачи и методику картирования.
6. Расскажите о биокомпьютерной технологии.
7. Опишите суть технологии клеточного компьютера.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНА. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ДНК

Генетика является наукой о наследственности и изменчивости организмов. Она призвана раскрыть законы: во-первых – наследственности и изменчивости при воспроизведении живого по поколениям; во-вторых – действия генетических программ при индивидуальном развитии особей; в-третьих – наследственности и изменчивости в процессах эволюции; в-четвертых – управления наследственностью и изменчивостью организмов.

Объектами генетики являются вирусы, бактерии, растения, животные и человек. За последние 30 лет генетика преобразилась под влиянием успехов учения молекулярных основ наследственности и изменчивости. Было показано, что наследственные свойства организмов записаны в структурах нуклеиновых кислот. Важнейшие задачи встали перед генетикой человека.

Наследственные болезни называются мутациями генов, также изменениями в структуре и числе хромосом. Некоторые генные болезни получили название молекулярных, т. к. была обнаружена сущность молекулярных изменений, являющихся первопричиной этих заболеваний. Генетика ставит задачу избавить человечество от наследственных биологических дефектов. Наличие наследственности, обусловленной биохимической и физиологической уникальности каждого человека, приводит медицину к необходимости изучать сущность индивидуального протекания болезней, природу несовместимости при пересадках органов, индивидуальную аллергическую реакцию, способность людей к адаптации к различным условиям жизни, в т. ч. к экстремальным – таким, как условия космоса, жизнь в глубинах океана.

2.1. Представление о гене

Ген – это элементарная единица наследственности, представляющая собой определенную специфическую последовательность нуклеотидов в ДНК. В хромосомах ди-

плоидных организмов гены расположены парами. Хромосома разделена на участки – локусы. Лocus – это место расположения того или иного гена в хромосоме. Сам ген состоит из двух или нескольких аллелей. Аллель – это один или несколько вариантов гена, которые могут находиться в данном локусе хромосомы. Таким образом, аллель представляет собой состояние гена, определяющее развитие данного признака.

Ген важен еще тем, что он ответственен за проявление действия мутаций. Мутация – это внезапно возникшее изменение генетической информации, обусловленное изменением структуры кодирующей ее молекулы ДНК. Мутации, в зависимости от точки приложения, могут изменить внешние признаки организма, его физические особенности, биохимические и биофизические процессы, нарушить развитие, ослабить жизнеспособность организма или даже привести его к гибели. Чаще всего мутации сопровождаются неблагоприятными последствиями. Генные мутации являются причиной развития некоторых болезней, например серповидноклеточной анемии.

Явление мутации лежит в основе эволюции и селекции живых организмов. В результате репликации ДНК наследственные признаки передаются потомству, но только мутации обеспечивают возникновение какого-либо нового признака. И уже затем этот новый признак передается по наследству.

Для изучения мутаций и их последствий в отношении организма используют вещества, которые искусственно вызывают мутации. Вещества, вызывающие мутации, называются мутагенами. К таким веществам относятся, например, соединения из группы акридинов. Акридины состоят из трех расположенных рядом углеводородных колец, что определяет их окрашивающие и мутирующие свойства. В частности, к акридинам относится вещество акрифлавин. Существуют и благоприятные мутации. Такие мутации приводят к тому, что замена, например, одной аминокислоты на другую сопровождается улучшением функционирования данного фермента. Такая мутация закрепляется в организме при последующем размножении вида.

Структура гена. Общее число генов в клетке высших организмов по разным оценкам составляет 50–200 тыс. Каждому структурному гену соответствует белок. Гены, кодирующие синтез белка, у эукариот состоят из нескольких постоянных элементов.

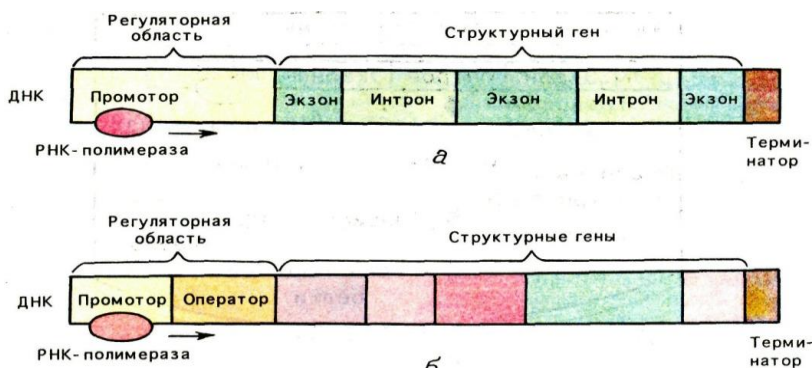


Рис. 1. Схема строения гена и его регуляторных элементов у эукариот (а) и оперона у прокариот (б)

Прежде всего это регуляторная область, которая оказывает заметное влияние на активность гена в разные периоды жизни организма. Регуляторная область включает промотор – последовательность ДНК длиной до 80–100 пар нуклеотидов, которую узнает молекула фермента РНК-полимеразы и соединяется с ней, чтобы начать транскрипцию данного гена. При этом промотор определяет, какая из цепей двойной спирали ДНК присоединит к себе РНК-полимеразу и тем самым будет служить матрицей для синтеза иРНК. За промотором расположена структурная часть гена, которая содержит в себе информацию о первичной структуре соответствующего белка. У прокариот за промотором расположен оператор – участок ДНК, «узнаваемый» специфическими белками-репрессорами и регулирующий транскрипцию отдельных генов. Оператор и управляемые им структурные гены в совокупности образуют функциональную единицу, называемую опероном. Кроме того, в хромосомах были найдены участки – усилители транскрипции,

расположенные на большом расстоянии от кодирующей последовательности гена и его промотора. Для нормальной работы гена очень важны также участки, расположенные в конце кодирующей последовательности и служащие сигналом остановки транскрипции. Их называют терминаторами.

В некоторых генах терминатор можно обнаружить и внутри кодирующей последовательности. Такой ген может полностью транскрибироваться только в присутствии так называемого белка-антитерминатора, позволяющего РНК-полимеразе «проскочить» внутренний терминатор.

Важная особенность генов эукариотических организмов – их прерывистость. Это значит, что если у прокариот в молекуле иРНК представлена вся нуклеотидная последовательность структурного гена, то у эукариот кодирующие участки гена – экзоны – чередуются с некодирующими вставками – интронами. Какова же причина такого явления? Дело в том, что гены, входящие в состав хромосом эукариот, содержат десятки и даже сотни тысяч нуклеотидных пар. Вместе с тем для кодирования белка среднего размера (содержащего от 300 до 400 аминокислотных остатков) требуется всего лишь 900–1200 нуклеотидных пар, которые в совокупности и представляют собой экзон. По размерам интроны варьируют от нескольких единиц до нескольких тысяч нуклеотидных пар; при этом их длина может быть больше длины экзонов, а число интронов в составе гена может достигать двух-трех десятков. Молекула мРНК, синтезированная с такого гена (содержащего не только экзоны, но и интроны), называется первичным транскриптом. Для того чтобы первичный транскрипт превратился в зрелую мРНК, требуется его предварительное созревание – процессинг. Для этого необходимо удалить (вырезать) некодирующие последовательности, или интроны, а кодирующие участки (экзоны) сшить (срастить) в единую молекулу. Этот процесс получил название сплайсинга РНК.

Экзоны ковалентно соединяются в молекулу транслируемой иРНК в том же порядке, в котором они располагаются в ДНК.

Структура гена вирусов отражает генетическую организацию клетки хозяина. Так, гены бактериофагов собраны

в опероны и не имеют интронов, а вирусы эукариот их имеют. В то же время в генетическом материале вирусов прокариот и эукариот обнаружена общая характерная черта – перекрывание генов. Например, в геноме фага ФХ174 ген В расположен внутри гена А, а ген Е – внутри гена D.

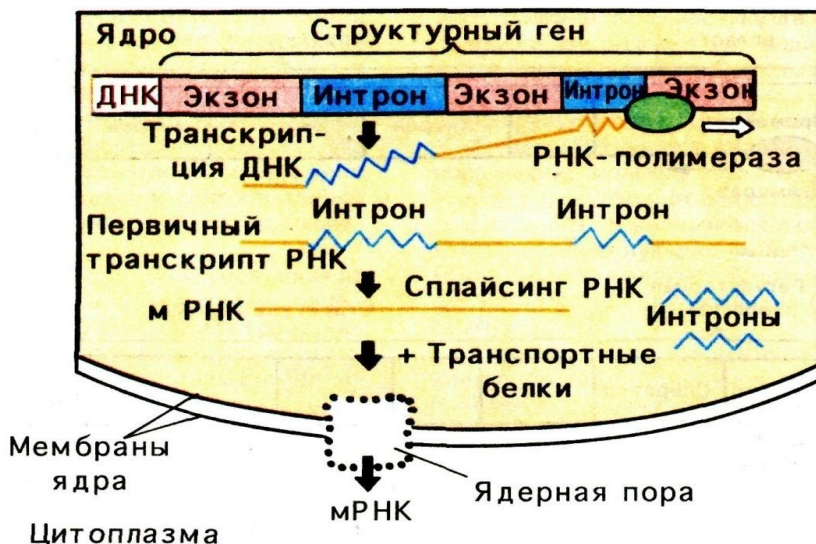


Рис. 2. Схема процессинга мРНК в ядре

Свойства генов. Характер проявления действия гена может изменяться в различных ситуациях и под влиянием различных факторов. В этом можно легко убедиться, если рассмотреть свойства генов и особенности их проявления в признаках:

- 1) ген дискретен в своем действии, т. е. обособлен в своей активности от других генов;
- 2) ген специфичен в своем проявлении, т. е. отвечает за строго определенный признак или свойство организма;

3) ген может действовать градуально, т. е. усиливать степень проявления признака при увеличении числа доминантных аллелей (дозы гена);

4) один ген может влиять на развитие разных признаков – это множественное действие гена;

5) разные гены могут оказывать одинаковое действие на развитие одного и того же признака (часто количественных признаков) – это множественные гены, или полигены;

6) ген может взаимодействовать с другими генами, что приводит к появлению новых признаков. Такое взаимодействие осуществляется опосредованно – через синтезированные под их контролем продукты своих реакций;

7) действие гена может быть модифицировано изменением его местонахождения в хромосоме (эффект положения) или взаимодействием различных факторов.

2.2. Состав, структура и свойства ДНК

Молекулы ДНК, выделенные из ядер клеток, в электронном микроскопе представлены в виде длинных нитей, состоящих из большого числа дезоксирибонуклеотидов. Нити ДНК толще и длиннее, чем нити белков. Длина молекулы ДНК достигает сотен тысяч нанометров. Это несравнимо больше самой крупной белковой молекулы, которая в развернутом виде достигает в длину не более 100–200 нм. Молекула ДНК по массе достигает $6 \cdot 10^{-12}$ грамма. Генетическая информация, заключенная в ДНК, состоит из последовательности нуклеотидов. ДНК состоит в основном из четырех нуклеотидов, которые соответствуют четырем азотистым основаниям: аденину, гуанину, тимину и цитозину. Кроме этих оснований, препараты ДНК могут содержать метилированные производные этих оснований. Основную структурную цепь молекулы ДНК образуют последовательно соединенные друг с другом молекулы пентозы и ортофосфорной кислоты. Цепь ДНК представляет углеводно-фосфатную последовательность, с которой соединены азотистые основания. Углеводные и фосфатные группы выполняют только структурную функцию. Молекулы ортофосфорной кислоты

соединяют между собой молекулы дезоксирибозы за счет образования химических связей. При взаимодействии гидроксильной группы третьего атома углерода одной молекулы пентозы с гидроксильной группой пятого углеродного атома другой молекулы пентозы отщепляется молекула воды. Тогда у остатков ортофосфорной кислоты сохраняется еще по одной гидроксильной группе, способной диссоциировать. Это обуславливает кислотные свойства всей макромолекулы ДНК.

Молекула ДНК имеет две цепи нуклеотидов, расположенных параллельно друг другу, но в обратной последовательности. Эти цепи удерживаются между собой за счет водородных связей между парами аденин – тимин и гуанин – цитозин. При этом азотистые основания располагаются внутри спирали. Водородные связи образуются между любыми электроотрицательными атомами, например кислородом тимина или азотом аденина и атомом водорода, ковалентно связанным с другим электроотрицательным атомом. Между аденином и тимином образуются две водородные связи, между гуанином и цитозином – три. Эти связи играют очень важную роль в поддержании вторичной структуры ДНК.

Дополнение аденина тимином и гуанина цитозином, иначе называемое комплементарностью, обеспечивает одинаковое по всей длине двойной спирали расстояние между цепями и образование между противоположными основаниями максимального числа водородных связей, что придает молекуле одновременно устойчивость и подвижность. Последовательность оснований в одной цепи ДНК строго соответствует последовательности оснований в другой цепи. Это является необходимым условием функционирования ДНК и передачи наследственной информации.

При необходимости двойная спираль ДНК легко рвется под действием фермента дезоксирибонуклеазы. Молекула ДНК в ядре клетки не существует изолированно сама по себе. Она окружена связанными с ней белками. Но белки не принимают участия в передаче наследственной информации. Основными белками, локализованными в ядре клеток и связанными с ДНК, являются специальные белки, называемые гистонами. Гистоны

обладают основными (щелочными) свойствами благодаря высокому содержанию в них основных аминокислот. По-видимому, их действие компенсирует в некоторой степени кислотные свойства нуклеиновых кислот. По преобладающему содержанию аминокислот выделяют пять важнейших гистонов: гистон Н1 имеет высокое содержание лизина, гистон Н2b лизина содержит меньше, чем предшествующий гистон, гистон Н2а имеет высокое содержание лизина и аргинина, гистон Н3 содержит большое количество аргинина, гистон Н4 богат аргинином и глицином.

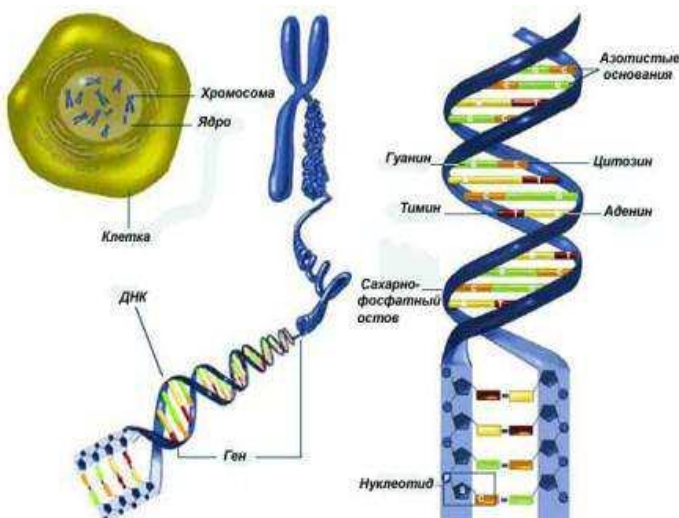


Рис. 3. Строение ДНК

Помимо ядерной ДНК, эукариотические клетки содержат небольшое количество цитоплазматической ДНК, т. е. ДНК, которая располагается в цитоплазме, за пределами ядра. Эта ДНК называется внеядерной. На долю внеядерной ДНК приходится около 0,1–0,2 всей клеточной ДНК. Внеядерная ДНК отличается от ядерной составом азотистых оснований и молекулярной массой. Она находится в митохондриях – постоянно присутствующих внутриклеточных органоидах,

участвующих в преобразовании энергии в клетке. Небольшое количество ДНК содержат некоторые пластиды растительных клеток, в частности хлоропласты, – пластиды, имеющие хлорофилл и участвующие в процессе фотосинтеза.

При нагревании ДНК денатурирует, т. е. разрушается. Денатурация двух цепочек ДНК происходит при температуре выше 90 °С, а инактивация (частичное разрушение) начинается при температуре 85 °С. При нагревании раствора ДНК и одновременном регистрировании оптической плотности раствора при длине волны 260 нм при определенной температуре произойдет резкое увеличение поглощения света раствором. Наблюдается так называемый гиперхромный эффект. Температура, при которой наблюдается гиперхромный эффект, называется температурой плавления. Гиперхромный эффект при температуре плавления связан с тем, что происходит разрыв водородных связей и нарушается упорядоченность молекулы ДНК. Понятие температуры плавления в отношении ДНК связывают с кристаллическим состоянием молекулы ДНК до соответствующей температуры и нарушением упорядоченной структуры при нагревании выше температуры плавления. Характер дифракции рентгеновских лучей также указывает на кристаллическое строение дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что с собой представляет ген?
2. Что такое оперон?
3. Какова функция ген-регулятора?
4. Дайте определение мутации.
5. Строение и функции ДНК.
6. Что придает молекуле ДНК одновременно устойчивость и подвижность?
7. Что такое денатурация, при какой температуре она образуется?
8. С чем связан гиперхромный эффект при температуре плавления?

3. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

Генная инженерия зародилась в начале 1970-х годов и добилась больших успехов. В 1978 г. впервые был получен инсулин генно-инженерным методом, а в 1980 г. была разработана технология получения соматотропина.

В результате таких манипуляций в реципиентной клетке синтезируются новые типы белков, которые ранее в ней отсутствовали, т. е. рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентной клетки и сообщают ей новые свойства.

Так были получены клетки бактерий *E.coli*, синтезирующие такие человеческие белки, как инсулин, соматостатин, гормон роста и др.

Технология рекомбинантных ДНК – это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой.

Основным объектом манипуляции в технологии рекомбинантных ДНК являются гены или фрагменты ДНК, кодирующие определенные белки.

Наиболее удачным подходом при переносе гена в реципиентную клетку является использование кольцевых молекул ДНК (векторов).

Такие векторные молекулы ДНК способны самостоятельно (независимо от ДНК клетки) существовать в клетках бактерий.

3.1. Понятие рекомбинантных ДНК

Рекомбинантная ДНК – искусственно созданная последовательность ДНК путем объединения нескольких последовательностей ДНК.

Части рекомбинантной ДНК могут быть получены искусственным путем или клонированы из организмов. Рекомбинантную ДНК получают с использованием живых клеток.

В настоящее время можно вырезать отдельные участки ДНК, получать нуклеотиды на ДНК-синтезаторах (приборах для

автоматического химического синтеза ДНК) практически в неограниченном количестве, определять последовательность нуклеотидов (разделяя, секвенируя их) сотнями в сутки, изменять выделенный ген, вводить его вновь в геном культивируемых клеток или эмбриона животного, где этот измененный ген начинает функционировать.

Эксперименты по клонированию включают следующие этапы:

- рестриктазное расщепление из организма-донора нужных генов нативной ДНК (клонлируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК);

- быстрая расшифровка всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, позволяющая определить точные границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую геном;

- обработка рестрикционными эндонуклеазами вектора для клонирования, который может реплицироваться в клетке-хозяине;

- сшивание ДНК-лигазой двух фрагментов ДНК с образованием новой рекомбинантной молекулы – конструкция «клонлирующий вектор – встроенная ДНК»;

- введение этой конструкции в клетку хозяина (реципиента), где она реплицируется и передается потомкам. Этот процесс называется трансформацией. После трансформации бактериальная клетка воспроизводит фрагмент клонируемой ДНК миллионами идентичных клеток;

- идентификация и отбор клеток, несущих рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки);

- получение специфичного белкового продукта, синтезированного клетками-хозяевами.

3.2. Конструирование рекомбинантных ДНК

Под рекомбинантными понимают ДНК, образованные объединением *in vitro* (в пробирке) двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников. Ключевыми в этом определении являются слова «фрагмент ДНК» и «объединение *in vitro*», что указывает на сущность

генетической инженерии и ее отличие от всех остальных методов получения гибридных (или химерных) организмов, таких как генетическая селекция, эмбриональная инженерия и т. д.

Фрагменты ДНК, в т. ч. и фрагменты, содержащие гены, получают с использованием ферментов рестриктаз. Рестриктазы могут образовывать фрагменты как с тупыми, так и с липкими концами. Сшивка фрагментов ДНК производится тремя основными методами, зависящими от того, какие концы имеют фрагменты сшиваемых ДНК. Рекомбинантные ДНК, сконструированные в лаборатории, состоят из фрагментов ДНК разных организмов, например ДНК бактерии (вируса) и человека.

Вставка – это чужеродная ДНК (ген), встроенная в вектор. В качестве вставки используется:

- геномная ДНК;
- гены, синтезированные *in vitro*;
- копии ДНК (кДНК).

Вектор – молекулы плазмидной или вирусной ДНК, которые могут быть использованы для введения в клетку чужеродной ДНК (вставки) с последующим размножением в клетке-хозяине.

Функции вектора – перенести выбранную ДНК в клетку-реципиент, встроить ее в геном хозяина, обеспечить селекцию (отбор) трансформированных клеток, обеспечить экспрессию гена и его размножение.

Характеристика вектора:

- небольшая молекула ДНК, которая способна проникать в клетку-хозяина;
- способен самостоятельно реплицироваться (содержит *ori*);
- должен иметь два селективных маркера для отбора трансформированных клеток и их клонирования.

В качестве генетических векторов используют:

1. Плазмиды – автономно существующие кольцевые внехромосомные молекулы ДНК, способные самостоятельно реплицироваться в клетке (содержат гены репликации и устойчивости к антибиотикам в качестве селективных маркеров). Для

получения вектора молекулы плазмидной ДНК укорачивают, вводят маркеры для селекции, промоторы.

2. Космиды – это плазмиды, которые содержат *cos*-сайты фага. Космиды могут быть упакованы в фаговый капсид и использованы для инфекции бактерий, в которых они размножаются как обычные плазмиды. Преимущество космид – могут включать больший фрагмент чужеродной ДНК, чем плазмиды.

3. Бактериофаг – (геном представлен двунитевой ДНК) и M13 (одноцепочечная ДНК).

4. Вирусные векторы – аденовирусы (геном представлен 2-х цепочечной ДНК) и ретровирусы (геном представлен РНК).

5. Челночные векторы – могут размножаться в разных клетках, например, бактериях и дрожжах, благодаря вставке двух сайтов *ori* – для клеток прокариот и эукариот.

6. Транскрипционные векторы – содержат промоторы для получения РНК-зондов.

7. YAC (*yeast artificial chromosomes*) – искусственные хромосомы дрожжей.

Сшивка по одноименным «липким» концам (рестриктазно лигазный метод). Некоторые рестриктазы, например *Pst* I, внося в цепи ДНК симметричные, расположенные наискось друг от друга разрывы на равных расстояниях от центра сайта узнавания и образующие «ступеньку». Эти комплементарные друг другу участки имеют тенденцию к ассоциации за счет спаривания оснований, и поэтому их называют комплементарными или липкими концами.

Спаривание оснований происходит только между комплементарными последовательностями, поэтому ААТТ-концы, образуемые *E.coli*, не будут спариваться, например, с АГЦТ-концами, образуемыми *Hind* III. Но любые два фрагмента (независимо от их происхождения), образовавшиеся под действием одной и той же рестриктазы, могут слипаться за счет образования водородных связей между однонитевыми участками комплементарных нуклеотидов.

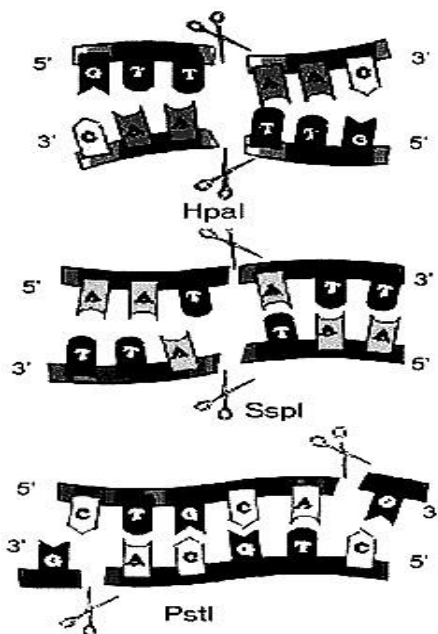


Рис. 4. Одни вносят разрывы по оси симметрии узнаваемой последовательности (Hpa I, Ssp I). Другие – со сдвигом, со «ступенькой» (Pst I)

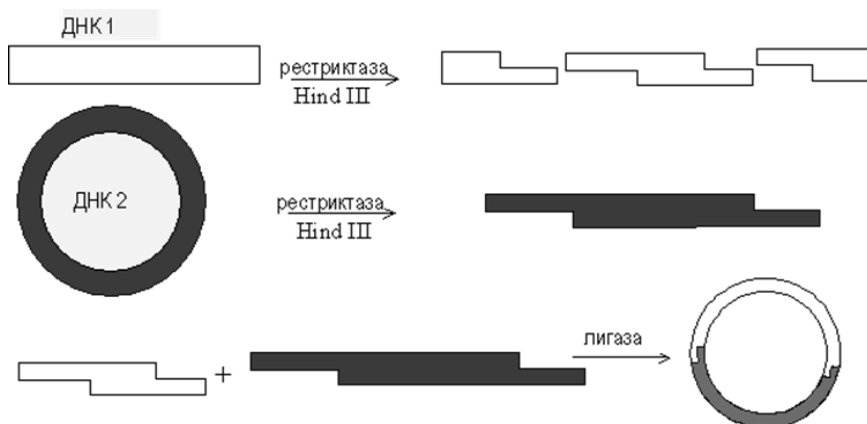


Рис. 5. Схема рестриктазно-лигазного метода

Однако после такого спаривания полная целостность двойной спирали не восстановится, поскольку останется два разрыва в фосфодиэфирном остове. Для ее восстановления, т. е. сшивания, или лигирования нитей используют фермент ДНК-лигазу. Этот фермент в живой клетке выполняет ту же функцию – сшивание фрагментов ДНК, синтезирующихся при репликации.

Сшивка по «тупым» концам (коннекторный метод). Липкие концы (не) абсолютно необходимы для связывания фрагментов ДНК. Тупые концы также могут быть соединены за счет действия ДНК-лигазы, если и лигаза, и тупые концы присутствуют в реакционной смеси в высоких концентрациях. В этом случае реакция лигирования имеет свои особенности и ее эффективность ниже, чем при сшивке по липким концам. Липкие концы также можно ферментативным путем присоединить к молекулам ДНК с тупыми концами. Для этого используют фермент – концевую трансферазу из тимуса телят, которая присоединяет нуклеотиды к трем концам цепей ДНК. Если к трем концам одного из рекомбинируемых *in vitro* фрагментов ДНК с помощью концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы достроить одно-цепочечные олиго (dA)-сегменты определенной длины, а к концам другого фрагмента – олиго (dT)-сегменты примерно такой же длины, то при смешении полученных таким образом фрагментов происходит спаривание за счет образования водородных связей между олиго (dA)- и олиго (dT)-последовательностями. Для ковалентного соединения двух фрагментов используется ДНК-лигаза. Эти процедуры составляют основу для второго общего метода получения рекомбинантных молекул ДНК.

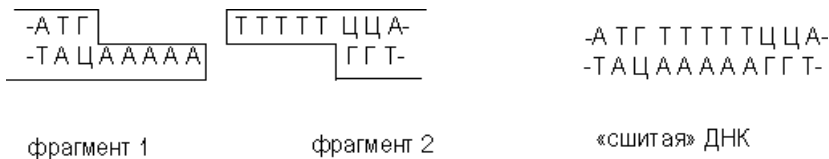


Рис. 6. Пришивание «липких» концов и сшивка фрагментов ДНК

Поскольку можно формировать достаточно длинные взаимокплементарные одноцепочечные концы, гибридные молекулы образуются с высокой эффективностью, поэтому при клонировании ДНКкопий мРНК, которые доступны в ограниченных количествах, обычно используют коннекторный метод. При таком способе соединения между фрагментами встраиваются участки ААААА. Такие дополнительные последовательности ТТТТТ могут влиять на функции соединяемых молекул и поэтому всегда, когда только возможно, для получения рекомбинантных молекул ДНК пользуются липкими концами, образовавшимися в результате действия рестриктаз.

Сшивка фрагментов с разноименными липкими концами. В ситуации, когда необходимо сшить фрагменты, образованные разными эндонуклеазами рестрикции, и имеющие разные, т. е. некомплементарные друг другу липкие концы, применяют так называемые линкеры (или «переходники»). Линкеры – это химически синтезированные олигонуклеотиды, представляющие собой сайты рестрикции или их комбинацию. Впервые эту идею предложил Шеллер с сотрудниками в 1977 году.

Существуют большие наборы таких генных «переходников». Естественно, что при использовании линкеров должна учитываться необходимость соблюдения правил экспрессии генетической информации. Часто в середину линкера помещают какой-либо регуляторный генетический элемент, например, промотор или участок, связанный с рибосомой. В этом случае линкеры обеспечивают не только объединение генов, но и обуславливают их экспрессию. Существуют линкеры «тупой конец – липкий конец».

При необходимости липкие концы можно превратить в тупые. Это достигается либо отщеплением липких концов с помощью фермента – эндонуклеазы S1, которая разрушает только одноцепочечную ДНК, либо липкие концы «застраивают», т. е. с помощью ДНК-полимеразы I на одонитевых липких концах синтезируют вторую нить.

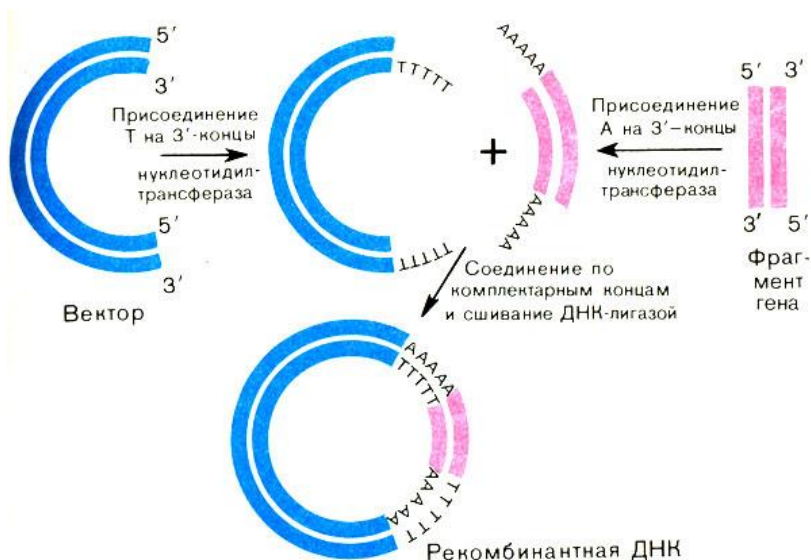


Рис. 7. Конструирование рекомбинантной ДНК по Лобану-Бергу

Недостаток такого подхода очевиден: П. Лобан и П. Берг использовали фрагменты ДНК, полученные при ее расщеплении случайным образом. Тем не менее их метод нашел дальнейшее развитие: во многих случаях оказалось удобным, расщепив рестриктазами вектор и ДНК с искомым геном, наращивать полученные концы комплементарными последовательностями. В 1980 г. П. Берг был одним из тех, кто получил Нобелевскую премию за работы, приведшие к созданию генной инженерии. П. Лобан же, завершив свою работу, покинул биологию.

3.3. Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК

Описанные методы, позволившие идентифицировать генетически важные участки ДНК, имели большое значение сами по себе. Но они также проложили путь к разработке исключительно эффективных методов секвенирования ДНК и создания рекомбинантных молекул. Секвенирование позволяет

довольно быстро определить полную нуклеотидную последовательность сегмента длиной 100–500 нуклеотидных пар, образующегося при расщеплении ДНК рестрикционными эндонуклеазами.

Метод Маскама и Гилберта (химический). Один из методов основанный на химической деградации ДНК. Он был предложен в 1976 г. Масмамом и Гилбертом и назван их именем. Суть метода сводится к следующему: один из концов фрагмента ДНК метят с помощью изотопа фосфора ^{32}P . В последнее время вместо радиоактивной вводят флюоресцирующую метку. Ее можно «цеплять» и к нуклеотидам, причем для каждого типа нуклеотидов подбирать различную окраску. Препарат меченой ДНК делят на четыре порции, и каждую из них обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно или два из четырех оснований, причем условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений.

Метод Сэнгера (ферментативный). Другой метод, разработанный Сэнгером и носящий его имя, основан не на химическом, а на ферментативном подходе. Сэнгер использовал ДНК-полимеразу I. В клетке этот фермент участвует в процессе репликации, заполняя пробелы между вновь синтезированными фрагментами ДНК (фрагментами Оказаки). Для работы фермента в пробирке требуются предшественники ДНК – дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTP), а также одноцепочная матрица, на которой должен быть небольшой двухцепочный участок – затравка, с которого начинается синтез. Были также синтезированы модифицированные дидезоксирибонуклеотиды, в которых дезоксирибоза 3'-ОН отсутствует, для каждого из четырех оснований ДНК. ДНК-полимераза включает эти предшественники в ДНК. Однако, включившись в ДНК, модифицированное основание не может образовать фосфодиэфирную связь со следующим дезоксирибонуклеотидом. В результате рост (элонгация) данной цепи останавливается (терминируется) в том месте, где в ДНК включился дидезоксирибонуклеотид (ddNTP). Поэтому их называют терминаторами элонгации.

В настоящее время определение точной нуклеотидной последовательности любого сегмента ДНК умеренной длины вполне разрешимая задача. Уже определена последовательность нескольких сотен генов про- и эукариот. Зная последовательность гена и генетический код, легко определить аминокислотную последовательность кодируемого им белка. Раньше для определения структуры белка приходилось делать тщательный и весьма трудоемкий анализ выделенного и очищенного белка. Сейчас часто бывает проще определить структуру белка через нуклеотидную последовательность, чем с помощью прямого секвенирования. „Если секвенирование белка занимает месяцы и даже годы, то ДНК удастся секвенировать за несколько недель.

Определение последовательности ДНК привело также к тому, что были обнаружены области, которые не кодируют белки, но принимают участие в регуляции экспрессии генов и репликации ДНК. В 1996 г. был секвенирован геном дрожжей, в 1998 г. – геном арабидопсиса, в 2000 г. – геном человека, однако в данном случае речь идет только об установлении последовательности нуклеотидов, т. к. генетическая структура и функции отдельных участков генома еще не идентифицированы – это более сложная задача.

3.4. Химерные ДНК против ВИЧ

Создаваемые генными инженерами рекомбинантные ДНК называют также химерными. Они были созданы для самых разнообразных целей, в т. ч. и для целенаправленного воздействия на ВИЧ. Число научных работ в этом направлении очень велико.

Одна из испытанных схем с использованием химерных ДНК заключалась в следующем. К гену, кодирующему белок-рецептор CD4, "подшили" другой ген, который обеспечивает синтез растительного белка рицина. Рицин еще в средние века использовался в качестве сильнейшего яда. Попадая в клетку, он блокирует синтез белка в цитоплазме, тем самым убивая ее. После внесения в клетки такой рекомбинантной ДНК в

конечном итоге происходит образование кодируемого ею химерного белка. Та его часть, которая соответствует белку-рецептору, обеспечивает строго специфическое связывание химеры с клетками, на поверхности которых содержится вирусный белок CD4. Другая же представляет собой яд рицин и уничтожает клетки, с которыми связывается химерная молекула. Таким образом, одна часть химеры обеспечивает направленный поиск в организме клеток, зараженных вирусом, а другая ее часть убивает их. Схема довольно проста и эффективна. В качестве "убийцы" можно использовать не только ген рицина, но и некоторые другие гены.

Другой подход к борьбе с ВИЧ-инфекцией основан на способности некоторых вирусных белков (Tat и Rev), чрезвычайно важных для размножения ВИЧ в клетках, специфически связываться с определенными участками молекулы вирусной РНК. Для того, чтобы предотвратить этот жизненно важный процесс, было предложено вводить в инфицированные клетки искусственно синтезированные РНК, содержащие участки связывания с вирусными белками. Вирусному белку все равно, с чем связываться – с вирусной РНК или точно такой же "копией", сконструированной искусственно. Добавленная в клетку в большом количестве "копия" играет в данном случае роль "ловушки": если ее много, белок вируса будет связываться преимущественно с ней, а не с РНК вируса, и, в результате этого, ВИЧ перестанет размножаться.

Теоретически описанные подходы выглядят очень привлекательно. И, как показали проведенные испытания, в изолированных клетках они работают очень хорошо. Однако нет надежных способов доставки и обеспечения долгого функционирования химерных "конструктов" в целом организме.

Указанные трудности ученые пытаются преодолеть с помощью тех же вирусов. Недавно опубликовано сообщение об успешном использовании для противодействия ВИЧ вируса бешенства. Естественно, это был не вирус сам по себе, а его вариант, который не способен приводить к заболеванию. К такому варианту был "пришит" ген белка CD4. В остальном схема была та же, что и в случае с рицином. Связываясь только

с ВИЧ-инфицированными клетками, рекомбинантный вирус их уничтожал, другие же клетки оставались неизменными. Возможно, такой путь окажется эффективным в будущем.

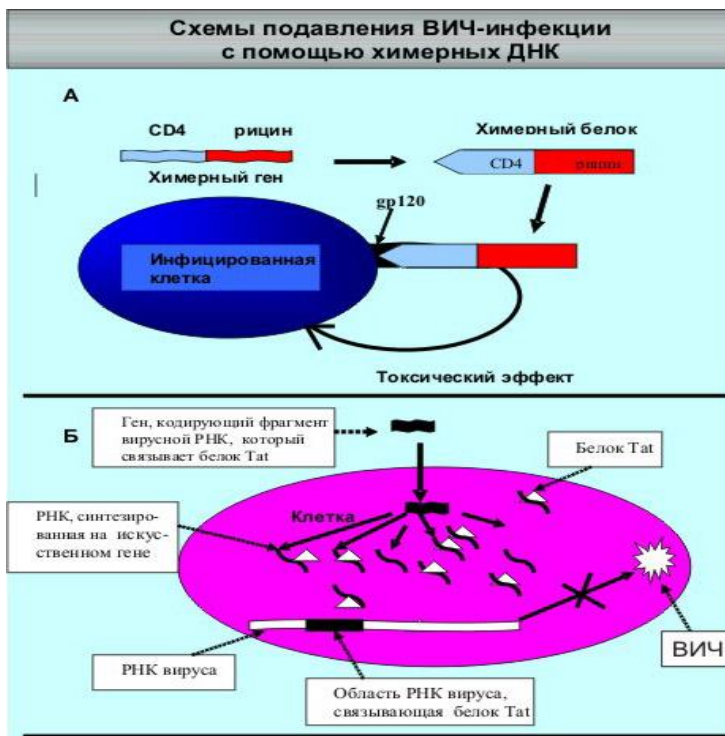


Рис. 8. spid Химерные ДНК для подавления ВИЧ-инфекции

Вопросы для самоконтроля:

1. Дайте определение рекомбинантной ДНК.
2. Какие этапы включают эксперименты по клонированию?
3. В чем суть рестриктазно-лигазного метода?
4. Объясните коннекторный метод.
5. Метод Маскама и Гилберта.
6. Метод Сэнгера.

4. МЕТОДЫ КЛОНИРОВАНИЯ ДНК

XX в. стал веком величайших открытий во всех областях естествознания, веком научно-технической революции, которая изменила облик Земли и ее обитателей, качество нашей жизни. Возможно, одной из основных отраслей знания, которые будут определять облик нашего мира в XXI в., является генетика. С этой сравнительно молодой наукой всегда было связано немало споров и противоречий, но последние достижения генетики и генной инженерии сделали возможным изменение самой сущности человека, породив тем самым множество вопросов этического и философского характера.

Пожалуй, ни одно из достижений науки не вызвало в минувшем веке столь бурных дебатов, как клонирование. Ещё несколько десятилетий назад клонирование являлось скорее предметом обсуждения писателей-фантастов, нежели научных дискуссий или общественно-политических дебатов. Стремительное развитие генной инженерии и расцвет биотехнологии в 1990 годы создали все условия к практической возможности клонирования живых существ. Научно-технический прогресс, как часто это бывает, воплотил всё в реальность.

Клонирование – это процесс, в ходе которого живое существо производится от единственной клетки, взятой от другого живого существа. Клонирование обычно определяется, как производство клеток или организмов с теми же нуклеарными геномами, что и у другой клетки или организма. Соответственно, путём клонирования можно создать любой живой организм или его часть, идентичный существующему или существовавшему, если сохранилась информация о его нуклеарных геномах.

Этот процесс потенциально дает всему человечеству невероятные возможности. Споры в научном мире между сторонниками и противниками клонирования с каждым годом становятся всё более ожесточенными. К сожалению, на обсуждение этой темы с самого начала оказывали влияние сенсационные, но вводящие в заблуждение сообщения СМИ, и

общая негативная эмоциональная реакция, порожденная научной фантастикой. В данной работе мы попытаемся разобраться как с преимуществами, так и с отрицательными последствиями клонирования животных и человека.

4.1. Биологическая сущность клонирования

Термин «клон» происходит от греческого слова «κλον», что означает – веточка, побег, черенок, и имеет отношение, прежде всего, к вегетативному размножению. Клонирование растений черенками, почками или клубнями в сельском хозяйстве, в частности в садоводстве, известно уже более 4000 лет. При вегетативном размножении и при клонировании, гены не распределяются по потомкам, как в случае полового размножения, а сохраняются в полном составе в течение многих поколений. Дело в том, что у растений (в отличие от животных) по мере их роста в ходе клеточной специализации – дифференцировки – клетки не теряют так называемых тотипотентных свойств, т. е. не теряют своей способности реализовывать всю генетическую информацию, заложенную в ядре. Поэтому практически любая растительная клетка, сохранившая в процессе дифференцировки свое ядро, может дать начало новому организму. Эта особенность растительных клеток лежит в основе многих методов генетики и селекции. Клетки животных, дифференцируясь, лишаются тотипотентности, и в этом – одно из существенных их отличий от клеток растений. Это – главное препятствие для клонирования взрослых позвоночных животных. Дифференцировка клеток в ходе развития позвоночных сопровождается инактивацией неработающих генов. Поэтому клетки теряют тотипотентность, дифференцировка становится необратимой. В конце концов, у одних клеток происходит полное репрессирование генома, у других – в той или иной степени деградирует ДНК, а в некоторых случаях разрушается даже ядро. Однако наряду с дифференцированными клетками культивируемые *in vitro* (в пробирке) клеточные популяции содержат малодифференцированные стволовые

клетки, которые и могут быть использованы как доноры ядер для клонирования млекопитающих.

4.2. Методы клонирования ДНК

Клонирование ДНК заключается в изолировании фрагмента ДНК, его соединении с вектором и размножении его в клетке-хозяине.

Векторами для клонирования являются молекулы ДНК, которые реплицируются независимо от хромосом хозяина, даже тогда, когда искусственно в них встраивают фрагмент чужеродной ДНК. Для самовоспроизведения вектор должен содержать два элемента:

- последовательность *ori* (начало репликации);
- ген, кодирующий белки SSB, которые подготавливают матрицу для репликации.

В качестве вектора используются плазмиды R, бактериофаг λ , вирус обезьян SV-40, космиды, искусственные бактериальные хромосомы (BAC), искусственные хромосомы дрожжей (YAC) и др. Выбор вектора для клонирования зависит от величины клонируемого фрагмента: маленькие фрагменты до 15 kb могут клонироваться в плазмидах, фрагменты до 50 kb в космидах и бактериофагах, фрагменты более 300 kb – в искусственных хромосомах BAC или YAC.

В качестве клетки-хозяина при клонировании используют бактерии (для плазмид, космид, бактериофагов, BAC), дрожжевые клетки (для плазмид и YAC), растительные клетки (для плазмид, вирусов), клетки животных (для вирусов). Существуют векторы, которые реплицируются в разных клетках-хозяинах – челночные векторы.

Гибридные молекулы, образованные из ДНК вектора и чужеродного фрагмента ДНК, называются рекомбинантными ДНК. Рекомбинантные ДНК могут быть получены следующим образом:

- выделение фрагмента ДНК для клонирования (участок ДНК или ген) и выбор вектора для клонирования;

- расщепление интересующего фрагмента и вектора той же рестриктазой, которая образует липкие концы;
- соединение полученных фрагментов фосфодиэфирными связями при помощи ДНК-лигазы, которая комплементарно соединяет липкие концы фрагментов.



Рис. 9. Схема получения рекомбинантной ДНК

Рекомбинантные молекулы вводятся в клетку-хозяин для клонирования. Через определенное время, благодаря независимой репликации вектора, образуются многочисленные копии исследуемого фрагмента или гена. Рекомбинантные молекулы выделяются из клетки хозяина, очищаются и разрезаются теми же рестриктазами, которые были использованы при их получении. Выделенные клоны ДНК используются для определения первичной структуры (последовательности нуклеотидов в молекуле), для рестрикционного картирования, получения молекулярных зондов, анализа функции соответствующих генов, синтеза необходимого белка (например инсулина, соматотропина, интерферона и др.). Идея амплификации очень сложных смесей фрагментов ДНК и последующего обнаружения одного из них казалась фантастичной,

а сейчас она представляется почти банальной. Основной принцип этого подхода состоит в создании коллекции рекомбинантных молекул, составляющих полный геном данного организма. По существу, полный нефракционированный набор фрагментов ДНК превращают в соответствующий набор стабильных рекомбинантов, который можно сохранять и многократно использовать для клонирования различных вставок. При этом применяются *E.coli* системы хозяин-вектор, где в качестве вектора используются плазмиды или бактериофаги, поскольку они более пригодны для получения большого числа рекомбинантных молекул и удобны для хранения.

После того, как ДНК сшита в пробирке, ее необходимо размножить. Существует два подхода к клонированию ДНК. Первый подход предполагает использование бактериальных или дрожжевых клеток для размножения введенной в них чужеродной ДНК. Второй способ представляет собой амплификацию ДНК *in vitro*.

Используя микроорганизмы, можно создавать два типа библиотек ДНК:

- геномную;
- клоновую (кДНК).

Геномная библиотека, создаваемая из суммарной геномной ДНК, в принципе должна содержать все гены данного организма. Однако такая цель обычно оказывается недостижимой, поскольку некоторые последовательности ДНК не удается клонировать. Один из вариантов геномной библиотеки представляет собой всю ДНК какой-то одной хромосомы. Для создания такой библиотеки необходимо выделить ДНК из отдельных хромосом. Хромосомы человека фракционируют с помощью методов, аналогичных используемым при сортировке флуоресцирующих и нефлуоресцирующих клеток. Метод основан на разной эффективности связывания флуоресцирующих красителей с хромосомами, которая зависит от размера хромосом и GC-содержания ДНК. Раствор окрашенных хромосом пропускают с высокой скоростью через узкое отверстие, на которое сфокусирован пучок света, испускаемого лазером. Хромосомы поочередно пересекают этот пучок, который индуцирует их

специфическую флуоресценцию. Детектор определяет интенсивность флуоресценции и изменяет направление движения тех хромосом, интенсивность флуоресценции которых превышает заданную величину, таким образом, что они попадают в специальный коллектор. Изменяя этот заранее установленный уровень интенсивности флуоресценции, можно отбирать разные хромосомы.

Отдельные хромосомы дрожжей и некоторых простейших невозможно идентифицировать цитогенетическими методами, однако ДНК из них все же удастся выделить. Для выделения применяют мягкие методы, чтобы избежать разрыва молекул. Затем ДНК подвергают электрофорезу в агарозном геле в условиях, позволяющих разделить молекулы длиной до 2000 т.п. н. Традиционные методы электрофореза не позволяют разделять дуплексные молекулы, размер которых значительно превышает 20 т.п. н. Скорость миграции столь больших молекул уже не зависит от их размера. Однако если вместо постоянного однонаправленного электрического поля, приложенного к обычному гелю, использовать поле, ориентация которого многократно меняется, то даже очень большие молекулы можно будет разделить по размерам. По-видимому, этот феномен объясняется механизмом прохождения молекул ДНК через поры агарозного геля. Предполагается, что молекулы вытягиваются в направлении поля, а затем при изменении этого направления переориентируются. Время переориентации зависит от длины цепи и угла между направлениями поля; они и определяют конечное расстояние, на которое перемещается молекула. В простейшем варианте импульсного электрофореза электрический ток подается импульсами, при этом направления поля примерно перпендикулярны друг другу, а само поле неоднородно. При более сложных распределениях используют однородные поля и оптимизируют угол между двумя направлениями, с тем чтобы повысить разрешение. Импульс обычно длится примерно минуту.

Библиотеки второго типа включают последовательности, составляющие всю мРНК, обнаруживаемую в определенных клетках. В этом случае популяцию мРНК превращают в популяцию молекул кДНК, которые затем клонируют. Геномные биб-

лиотеки представляют собой собрание генов и последовательностей ДНК; в библиотеках кДНК представлены продукты экспрессии этих генов в форме мРНК.

4.2.1. Геномные библиотеки

Геномные библиотеки обычно создают с помощью векторов, сконструированных на основе бактериофага X или космиды. Эти векторы содержат большие вставки, благодаря чему минимизируется число рекомбинантов, необходимых для составления библиотеки. Например, если создается X-библиотека генома млекопитающего, содержащего $3 \cdot 10^9$ п. н. при средней длине вставки 17 т.п. н., то весь геном будет представлен $3 \cdot 10^9 / 1,7 \cdot 10^4 = 1,8 \cdot 10^5$ рекомбинантами. На самом деле для создания библиотеки, вероятность обнаружения в которой определенного сегмента генома превышает 99 %, нужно получить $\sim 10^6$ отдельных рекомбинантных молекул, поскольку лигирование отдельных фрагментов происходит случайно. Так, некоторые фрагменты могут быть включены более чем в одну векторную молекулу, а другие могут вообще не участвовать в лигировании и упаковке. Полная космидная библиотека содержит меньше рекомбинантных молекул, поскольку размер вставок может достигать 45 т.п. н.

Фрагменты суммарной геномной ДНК для конструирования библиотек можно получать несколькими способами. Наиболее удобный из них состоит в частичном расщеплении ДНК рестриктирующей эндонуклеазой, сайт узнавания которой содержит шесть оснований, а образующиеся липкие концы соответствуют липким концам выбранного вектора. В этом случае разрезание осуществляют лишь в ограниченном числе возможных сайтов. Поскольку выбор таких сайтов производится случайно и в используемом препарате геномной ДНК содержится много копий любого геномного сегмента, практически каждый сегмент ДНК должен быть представлен во фрагментах ДНК, пригодных по своему размеру для клонирования. При таком подходе, однако, может получиться неполная библиотека. Те части генома, в которых сайты узнавания рестриктирующих эндонуклеаз находятся слишком далеко друг от друга, не смогут включиться в

жизнеспособный рекомбинантный фаг. С другой стороны, те области генома, в которых сайты узнавания тесно сгруппированы, будут разделены на очень короткие фрагменты, и не все из них будут представлены в библиотеке.

Вообще говоря, более репрезентативную библиотеку можно получить при частичной фрагментации геномной ДНК, осуществляемой более случайно, чем с помощью фермента с сайтом узнавания из шести пар оснований. Для этого можно использовать гидродинамические методы деградации ДНК или очень ограниченную обработку эндонуклеазами с сайтами узнавания из четырех пар оснований, например *Alu I* и *Hae III*.

4.2.2. *кДНК библиотеки*

Для создания библиотек *кДНК* обычно используют плазмидные или фаговые векторы, сконструированные на основе бактериофага *X*. Принципы конструирования не отличаются от описанных, за исключением того, что в этих случаях чаще используют смесь разных *мРНК*, а не очищенную *мРНК*. Полученные с помощью специально сконструированных векторов или определенным образом отобранные библиотеки *кДНК* могут использоваться для клонирования последовательностей *мРНК* даже в тех случаях, когда аминокислотная последовательность белка и кодирующая нуклеотидная последовательность неизвестны и даже отсутствует гомологичный зонд.

Библиотека экспрессирующихся *кДНК*. Очищенную *кДНК* или смесь разных *кДНК* можно лигировать с векторами, специально сконструированными для осуществления транскрипции и трансляции кодирующей области *кДНК*. Нужный клон идентифицируют с помощью иммунологического скрининга с применением антител, специфичных к полипептиду, кодируемому данной *кДНК*. Эта весьма удобная методика позволяет осуществить клонирование даже тогда, когда ничего не известно о структуре нужного нам гена или белка.

Одним из векторов, широко применяемых для изучения экспрессии, является производное фага *X*, получившее название *Xgt11*. Когда *кДНК*, содержащие *EcoRI*-линкеры, включаются в

вектор Xgt11 в его единственном сайте для эндонуклеазы EcoRI, вставки оказываются в области, кодирующей бактериальный ген в-галактозидазы. Примерно одна из шести кДНК-вставок включается в подходящей для транскрипции ориентации и в фазе с рамкой считывания в-галактозидазы. При индукции в-галактозидазного гена с помощью в-галактозида в lac-промоторе начинается транскрипция, которая распространяется на эукариотический сегмент. В результате трансляции соответствующей РНК образуется гибридный белок, у которого на N-конце находится в-галактозидазный полипептид, а на C-конце – эукариотический. Библиотека кДНК, созданная с помощью A. gt11, образует популяцию бляшек, отдельные члены которой содержат эти гибридные белки. Бляшку, содержащую интересующий нас белок, идентифицируют по ее способности связывать соответствующее антитело. На одной чашке можно выявить одну позитивную бляшку среди 10^4 и без труда провести скрининг 10^6 бляшек.

Библиотеки селективных кДНК. Развитие и дифференцировка сложных многоклеточных организмов из одной оплодотворенной яйцеклетки осуществляются с помощью высокоорганизованной системы дифференцированной экспрессии генов. Одни гены экспрессируются только в одном или строго ограниченном числе типов клеток, другие – в какой-то определенный период времени. В результате популяции цитоплазматических мРНК в различных тканях и клетках оказываются представленными разными молекулами. Такая дифференцированная экспрессия генов может использоваться для клонирования кДНК, соответствующих регулируемым генам, даже в тех случаях, когда о продуктах этих генов ничего не известно.

Например, при изучении процессов раннего развития Xenopus важно знать, какие гены экспрессируются при первых клеточных делениях. Для этого нужно идентифицировать те мРНК, которые присутствуют в гастрوله, но не в яйцеклетках. Это можно сделать, создав геномную библиотеку и проведя отдельный скрининг с использованием препаратов РНК из яйцеклеток и гаструл. Затем можно идентифицировать и клонировать фаговые бляшки, которые дают положительный ответ при отжиге только с РНК

гаструл. Однако данный метод имеет тот недостаток, что многие из 10^5 или более мРНК в двух указанных выше препаратах являются одинаковыми и приходится проводить скрининг громадного числа бляшек, чтобы обнаружить те немногие, которые проявляют специфичность. Более эффективным является создание библиотеки кДНК на основе гастркулярной РНК.

4.3. Доводы за и против клонирования

Уже известно, что, по крайней мере, 8 исследовательских групп по всему миру работают над клонированием человека. На протяжении 2002 г. всё больше и больше стран "дают законодательское добро" на клонирование, в основном в терапевтических целях, несмотря на активный протест Ватикана и международные акты, запрещающие клонирование человека. В этом направлении двигаются Германия, Франция, Австралия и другие аналогично настроенные державы. В США первым штатом, регламентировавшим терапевтическое клонирование, стала Калифорния. Использование эмбрионов для исследования потенциала стволовых клеток, по свидетельству специалистов, может совершить в медицине революцию, предложив возможности для такой трансплантации тканей, которая предотвратит или излечит множество самых серьезных человеческих недугов. Эмбрион представляет собой шарообразное скопление клеток, которые развиваются в утробный плод, когда стволовые клетки примерно через 14 дней начинают дифференцироваться для формирования нервной системы, позвоночника и прочих элементов организма. Ученые полагают, что выделяя стволовые клетки из эмбриона, когда срок его жизни составляет от 3 до 4 дней, их рост в лабораторных условиях можно будет направить в любом направлении. Таким образом, появится возможность для выращивания нужных клеток или типов тканей для трансплантантов. И однажды станет возможно выращивать нейроны для замены нервных клеток в мозге, погибающем от болезни Паркинсона, выращивать кожу для лечения ожогов или панкреатические клетки для выработки инсулина диабетикам. Теоретически, стволовые клетки способны вырасти в заменитель

для практически любой части человеческого тела. Если же они получены на основе клеток, взятых у того же самого человека, которому выращивают трансплантант, то не будет никаких проблем с отторжением тканей.

Клонирование – это хорошо или плохо? У каждого человека свое мнение на этот счет.

Ученым необходимо, чтобы наука развивалась дальше. Они будут ставить свои опыты даже несмотря на запреты.

Медики выступают за терапевтическое клонирование – ведь это поможет оказать реальную помощь человеку и спасти ему жизнь.

Представители почти всех профессий против клонирования вообще, т. к. они утверждают, что человек не может творить подобно Богу.

Общественное мнение направлено в основном тоже против бездумного клонирования всего и вся.

Политики многих стран издали моратории и законопроекты, запрещающие деятельность по клонированию, по крайней мере, в отношении человек.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое клонирование? И каковы его преимущества?
2. Дайте определение клона.
3. В чем отличия клонирования животного и растения?
4. Какие элементы должен содержать вектор для самовоспроизведения?
5. Объясните получение рекомбинантных ДНК.
6. Что представляют с собой геномные библиотеки?
7. Библиотеки кДНК. Виды библиотеки кДНК.
8. Принцип библиотеки селективных кДНК.
9. В чем отличие геномной от кДНК библиотеки?

5. МЕТОДЫ РЕПАРАЦИИ ДНК

Репарация (от лат. reparatio – восстановление) – особая функция клеток, заключающаяся в способности исправлять химические повреждения и разрывы в молекулах ДНК, повреждённой при нормальном биосинтезе ДНК в клетке или в результате воздействия физических или химических агентов. Осуществляется специальными ферментными системами клетки. Ряд наследственных болезней (напр., пигментная ксеродерма) связан с нарушениями систем.

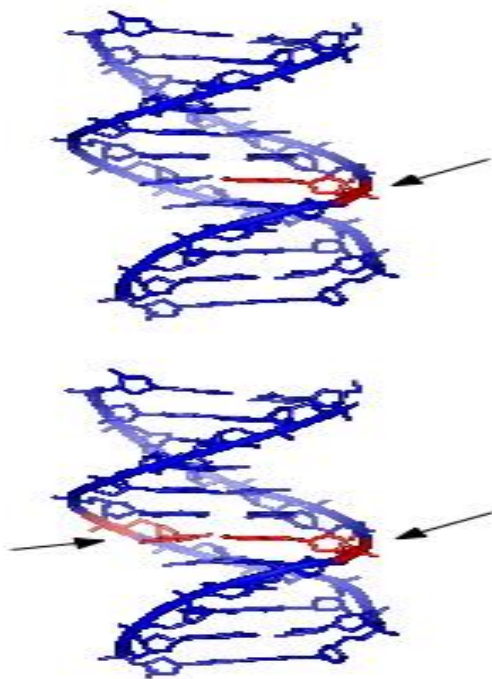


Рис. 10. Однонитевое и двунитевое повреждение ДНК

Удивительная стабильность генетического материала – ДНК связана отнюдь не с ее консервативностью, а с существованием в клетках всех живых организмов специальных

систем репарации, устраняющих из ДНК возникающие в ней повреждения.

Явление репарации или восстановления жизнеспособности клетки, после действия рентгеновых лучей было открыто в 1958 г. В. И. Корогодиным у диплоидных дрожжей. Повреждения ДНК, возникающие при действии излучений и химических агентов, в конечном счете приводят к нарушению регулярной Уотсон – Криковской структуры, что выражается в локальной денатурации молекулы и приводят к частичному или полному блокированию репликации. Именно такие нарушения конформации, а не конкретные изменения мономеров служат мишенью для большинства систем репарации ДНК.

5.1. Фотореактивация как основной метод репарации

Начало изучению репарации было положено работами А. Келнера (США), который в 1948 г. обнаружил явление фотореактивации (ФР) – уменьшение повреждения биологических объектов, вызываемого ультрафиолетовыми (УФ) лучами, при последующем воздействии ярким видимым светом (световая репарация).

Р. Сетлоу, К. Руперт (США) и другие вскоре установили, что фотореактивация – фотохимический процесс, протекающий с участием специального фермента и приводящий к расщеплению димеров тимина, образовавшихся в ДНК при поглощении УФ-кванта.

Позднее при изучении генетического контроля чувствительности бактерий к УФ-свету и ионизирующим излучениям была обнаружена темновая репарация – свойство клеток ликвидировать повреждения в ДНК без участия видимого света. Механизм темновой репарации облученных УФ светом бактериальных клеток был предсказан А. П. Говард-Фландерсом и экспериментально подтвержден в 1964 г.

Ф. Ханавальтом и Д. Петиджоном (США). Было показано, что у бактерий после облучения происходит вырезание поврежденных участков ДНК с измененными нуклеотидами и ресинтез ДНК в образовавшихся пробелах.

Системы репарации существуют не только у микроорганизмов, но также в клетках животных и человека, у которых они изучаются на культурах тканей. Известен наследственный недуг человека – пигментная ксеродерма, при котором нарушена репарация.

В настоящее время выявлены три основных механизма репарации ДНК: фотореактивация, эксцизионная репарация и пострепликативная репарация. Последние два типа называют также темновой репарацией.

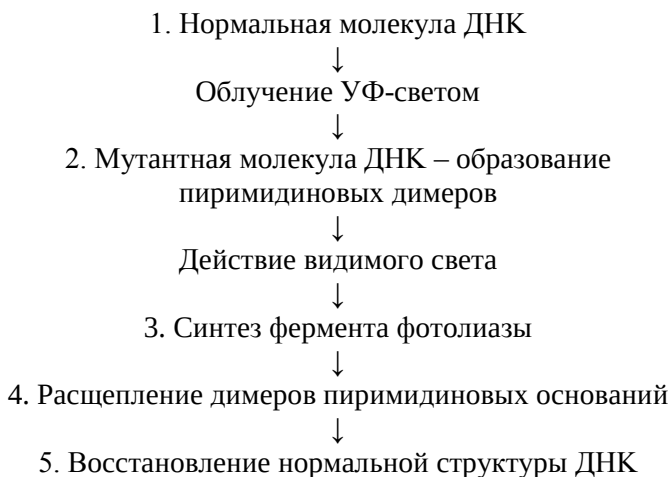
Явление фотореактивации заключается в восстановлении биологической активности клеток или молекул ДНК, поврежденных ультрафиолетовым излучением в результате последующего воздействия видимого света.

При фотореактивации происходит мономеризация цикlobутановых димеров тимина и других пиримидиновых димеров *in situ*. Известна так называемая неферментативная коротковолновая фотореактивация, которая заключается в мономеризации димеров при действии ультрафиолетового света с длиной волны 240 нм, а также ферментативная фотореактивация. Именно последнюю обычно и подразумевают под собственно фотореактивацией.

Фотореактивация при действии видимого света (300 – 400 нм – наиболее активная часть спектра) была обнаружена в 1949 г. в нескольких лабораториях. Механизм этого явления был раскрыт в начале 60-х годов прошлого века после выделения К. Рупертом из клеток микроорганизмов фермента фотореактивации – дезоксирибопиримидинфототиазы. Экстракты дрожжей оказались способными восстанавливать трансформирующую активность ДНК *Haemophyllum influenzae* на свету.

Субстратом фермента фотореактивации служат димеры пиримидиновых оснований, с которыми он образует комплекс в темноте (с неповрежденной ДНК фермент не связывается). На свету комплекс распадается, при этом происходит мономеризация димеров. В клетке эукариот фермент локализован в ядре, у прокариот – в непосредственной близости к нуклеоиду. В частности, он не обнаруживается в безнуклеоидных миниклетках, которые образуют некоторые мутанты *E.coli*.

Схематически световая репарация выглядит следующим образом:



Полагают, что от 80 до 90 % всех раковых заболеваний связаны с отсутствием репарации ДНК.

Повреждение ДНК под воздействием факторов окружающей среды, а также нормальных метаболических процессов, происходящих в клетке, происходит с частотой от нескольких сотен до 1000 случаев в каждой клетке каждый час.

Известен мутант *phr E.coli*, у которого блокирована фотореактивация. При облучении видимым светом у этого мутанта не исчезают тиминовые димеры из ДНК.

Фермент фотореактивации широко распространен в природе и обнаружен даже у таких примитивных свободноживущих микроорганизмов, как микоплазмы, найден он в клетках многих высших растений и животных. Он есть у всех изученных бактерий, за исключением *Micrococcus radiodurans*, который тем не менее чрезвычайно устойчив к действию ультрафиолетового света: он выдерживает дозы, в 1000 раз более высокие, чем те, которые убивают *E.coli*. При полном отсутствии способности к фотореактивации *M.radiodurans* обладает мощной системой эксцизионной репарации.

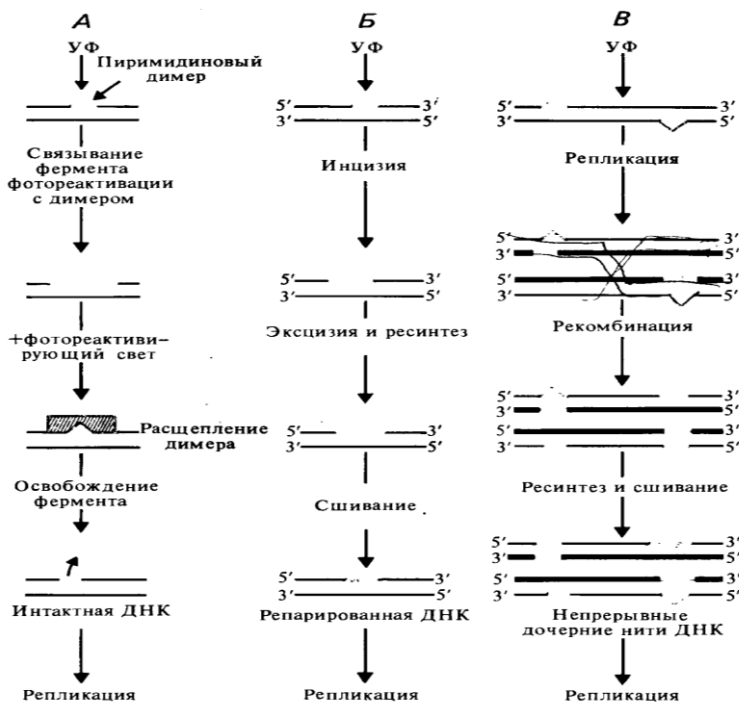


Рис. 11. Схема механизмов репарации на примере пострадиационного (УФ) восстановления структуры ДНК (по Р. Hanawalt, 1975, Е. Witkin, 1976): А – фотореактивация; Б – эксцизионная репарация; В – пострепликативная репарация

5.2. Удаление поврежденного участка ДНК

Эксцизионную репарацию, т. е. связанную с удалением поврежденного участка ДНК, называют также репарацией по типу выщепления – замещения или более образно «механизм реж – латай». Эксцизионная репарация не столь специфична в отношении повреждений ДНК, как фотореакция, тем не менее наиболее подробно изучена именно репарация ДНК, содержащая тиминовые димеры. Этому способствовало то обстоятельство, что возможность фотореактивации клеток –

критерий присутствия тиминовых димеров в ДНК. Появление димеров приводит к локальной денатурации ДНК, что влечет за собой нарушение процесса репликации: каждый тиминовый димер в ДНК *E.coli* задерживает репликацию на 10 с.

Доказательство существования и изучение механизма эксцизионной репарации стало возможным благодаря получению мутантов *E.coli*, чувствительных к летальному действию ультрафиолетового света. Если штаммы *E.coli*, устойчивые к ультрафиолетовому свету, инкубировать в темноте после облучения, то из их ДНК удаляются тиминовые димеры. Нефть, добытая с применением биотехнологии, сравнима по себестоимости с нефтью, добытой первичным и вторичным способами из активных запасов. Микробиологическая технология вписывается в схему вторичной добычи и требует минимальное дополнительное оборудование – компрессор для нагнетания воздуха и эжектор для введения минеральных солей. У мутантов, чувствительных к ультрафиолетовому свету, этого не происходит.

Эксцизионная репарация представляет собой многоэтапный процесс и заключается в:

- 1) «узнавании» димера;
- 2) надрезании одной цепи ДНК вблизи димера – инцизии;
- 3) удалении димера – эксцизии;
- 4) ресинтезе ДНК;
- 5) восстановлении непрерывности репарируемой цепи за

счет образования ковалентных связей сахарофосфатного скелета молекулы.

«Узнавание» повреждения в ДНК осуществляет фермент УФ-эндонуклеаза, которая реагирует не только на димеры тимины, но и на многие другие изменения, приводящие к локальному нарушению структуры ДНК. Эндонуклеаза ответственна и за инцизию, т.е. надрезание одной цепи ДНК непосредственно около димера с 5'-конца в поврежденной цепи. Эксперименты *in vitro* с облученной ДНК показали, что число одонитевых разрывов оказывается равным числу димеров в молекуле.

Эксцизию или вырезание димера из молекулы ДНК, осуществляет другая нуклеаза. Димер удаляется в составе

короткого олигонуклеотида (3 – 5 оснований), что может сопровождаться дальнейшей деградацией поврежденной спирали. Продукты деградации облученной ДНК, содержащие тиминовые димеры, можно обнаружить в клетках. У некоторых бактерий димеры находили и в культуральной среде. Деградацию ДНК осуществляет АТФ – зависимая ДНКаза. В результате эксцизии и последующей деградации ДНК образуются одностранные бреши или пробелы.

Ресинтез ДНК, в результате которого заполняются бреши, идет с использованием в качестве матрицы интактной цепи. Такой репаративный синтез ДНК напоминает «дополнительную» репликацию, обнаруженную в пахитене у эукариот. Прямое доказательство репаративного синтеза у бактерий получили Д. Петтиджон и Ф. Хэнзуолт, использовавшие для этой цели метод М. Мезельсона и Ф. Сталя.

Нарушения процессов репарации ДНК обнаружены у людей, пораженных наследственным заболеванием – пигментной ксеродермой. Известно несколько типов этой болезни: ХРІ, ХРІІ, ХРvar, общими симптомами которой служит повышенная чувствительность к солнечному свету, приводящая к развитию рака кожи. Культура клеток больных ХРІ чувствительна к ультрафиолетовому свету, но не к ионизирующим излучениям. У этих больных дефект эксцизионной репарации связан с отсутствием активности УФ-эндонуклеазы. В культуре клеток здоровых людей после облучения ультрафиолетовым светом в дозе 10 Дж/м² через 20 ч из ДНК исчезает до 90 % тиминовых димеров (со скоростью 40 000 димеров в час), в то время как в клетках больных ХРІ димеры вообще не удаляются из ДНК.

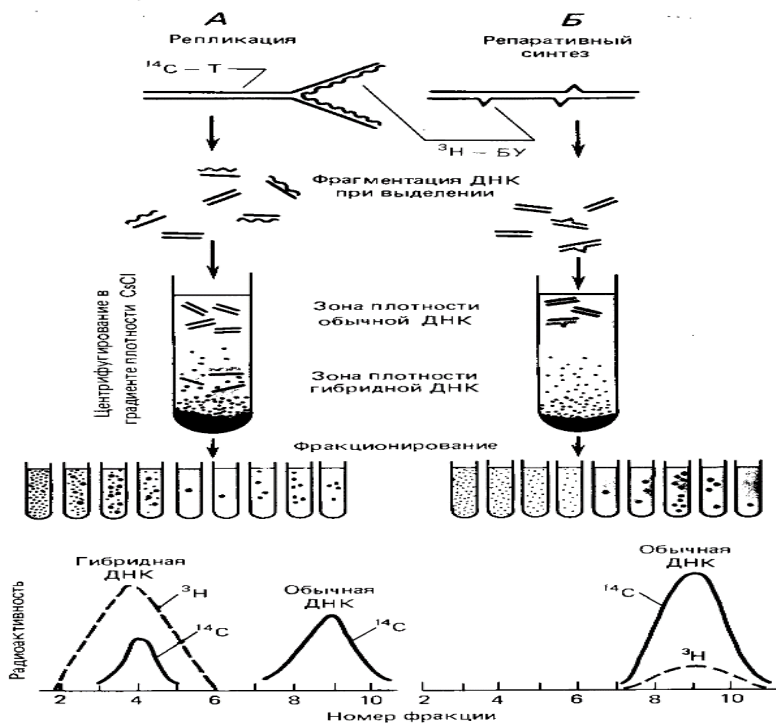


Рис. 12. Схема опыта Д. Петтиджона и Ф. Хэнеуолта, доказывающая существование репаративного синтеза ДНК в клетках *E.coli*, облученных ультрафиолетовым светом:

А – репликативный синтез ДНК; Б – репаративный синтез ДНК

5.3. Пострепликативная репарация

Пострепликативная репарация была открыта в клетках *E.coli*, не способных выщеплять тиминовые димеры. Это единственный тип репарации, не имеющий этапа узнавания повреждения.

Пострепликативная репарация осуществляется путем рекомбинации (обмена фрагментами) между двумя вновь образованными двойными спиралями ДНК. Примером такой пострепликативной репарации может служить восстановление нормальной структуры ДНК при возникновении тиминовых

димеров (Т-Т), когда они не устраняются самопроизвольно под действием видимого света (световая репарация) или в ходе дорепликативной эксцизионной репарации.

Ковалентные связи, возникающие между рядом стоящими остатками тимина, делают их неспособными к связыванию с комплементарными нуклеотидами. В результате во вновь синтезируемой цепи ДНК появляются разрывы (бреши), узнаваемые ферментами репарации. Восстановление целостности новой полинуклеотидной цепи одной из дочерних ДНК осуществляется благодаря рекомбинации, с соответствующей ей нормальной материнской цепью другой дочерней ДНК. Образовавшийся в материнской цепи пробел заполняется затем путем синтеза на комплементарной ей полинуклеотидной цепи. Проявлением такой пострепликативной репарации, осуществляемой путем рекомбинации между цепями двух дочерних молекул ДНК, можно считать нередко наблюдаемый обмен материалом между сестринскими хроматидами.

На гораздо более длинных отрезках – 1000–1500 нуклеотидов. По-видимому, эту реакцию и осуществляет ДНК – полимеразы II.

Последний этап эксцизионной репарации заключается в восстановлении непрерывности репарируемой цепи ДНК с помощью фермента ДНК – лигазы, кодируемого геном *lig E.coli*. Температурочувствительные мутанты по этому гену не способны не только завершать процесс эксцизионной репарации в непермиссивных условиях, но и накапливают фрагменты оказавшиеся при репликации ДНК.

Различные варианты эксцизионной репарации широко распространены у про- и эукариотических организмов. Она обнаружена у простейших (например, *Tetrachimena pyriformis*), в культуре клеток млекопитающих. Удаление тиминовых димеров из клеток млекопитающих сопровождается так называемым внеплановым синтезом ДНК, который происходит по репаративному типу: вне S – фазы клеточного цикла. Он аналогичен пахитенному синтезу ДНК в мейозе. Внеплановый синтез ДНК показан в зародышевых клетках и на постмейотических стадиях гаметогенеза

В процессе реплакации, в результате ошибок полимеразы, могут встраиваться некомплементарные нуклеотиды, что может привести к мутациям в дочерней цепи ДНК. Неспаренные основания узнаются ферментами мисмэтч репарации и осуществляют замену ошибочно спаренных нуклеотидов.

Ферменты данной системы обеспечивают гомологичную рекомбинацию, а также задержку клеточного цикла в ответ на повреждения ДНК.

Система репарации ошибочно спаренных нуклеотидов у *E. coli*, использующая белки MutHLS, распознает и репарирует все некомплементарные пары оснований за исключением C–C. Кроме того, эта система репарирует небольшие вставки в одну из цепей ДНК, образующиеся в результате ошибок репликации, длина которых не превышает четырех нуклеотидов.

Обычно у *E. coli* ДНК метилирована Dam-метиلاзой по сайтам GATC. Однако после завершения репликации дочерняя цепь ДНК некоторое время остается неметилованной.

Эта система может быть реконструирована *in vitro* с использованием

ДНК с одной метилированной цепью в качестве субстрата, к которой добавляются очищенные белки MutH, MutL, MutS, UvrD (хеликаза II), холофермент ДНК-полимеразы III, ДНК-лигаза, белок SSB, а также одна из экзонуклеаз: ExoI, ExoVII или RecJ. Процесс репарации инициируется внесением одноцепочечного разрыва в неметилованную цепь вблизи частично метилированного сайта GATC с последующим гидролизом цепи ДНК и заполнением образующейся одноцепочечной брешы. При этом белок MutS связывается с ошибочно спаренными нуклеотидами. У белка MutL не обнаружено ферментативной активности, хотя он взаимодействует с MutS и необходим для активации MutH-эндонуклеазы, осуществляющей одноцепочечный разрыв ДНК. Таким образом, комплекс MutS–MutL, собранный на участке ДНК с ошибочно спаренным нуклеотидом, стимулирует эндонуклеазную (никазную) активность MutH. Бесклеточная система не требует присутствия MutH при наличии в ДНК-субстрате одноцепочечного разрыва. MutHLS-система

репарации может использовать частично метилированные последовательности GATC, расположенные выше и ниже поврежденного участка ДНК. При этом в вырезании ошибочно включенного нуклеотида помимо хеликазы II принимает участие одна из экзонуклеаз: *EcoI* (3'-экзо), *EcoVII* (3'- и 5'-экзо) или *RecJ* (5'-экзо) в зависимости от расположения GATC-сайта по отношению к корректируемому нуклеотиду. Вслед за вырезанием нуклеотида образовавшаяся одноцепочечная брешь заполняется холоферментом ДНК-полимеразы III в присутствии SSB-белка и ДНК-лигазы. Следует подчеркнуть, что использование белка MutH и Dam-метилазы для распознавания дочерней цепи реплицировавшейся ДНК является уникальным свойством грамотрицательных бактерий. У грамположительных бактерий не происходит метилирование цепей ДНК в целях маркировки. Если сайты GATC полностью метилированы, MutHLS-система репарации *E. coli* изменяет ошибочно спаренные нуклеотиды в обеих цепях ДНК с одинаковой эффективностью.

У *E. coli* существуют, по крайней мере, еще два специфических пути репарации ошибочно спаренных нуклеотидов. Система VSP (very short patchrepair pathway) репарирует некомплементарные пары G–T, заменяя их на G–C. Считается, что такие пары образуются в результате дезаминирования 5-метилцитозина в сайтах, где остатки C метилированы Dcm-метилазой. С более низкой эффективностью эта же система заменяет пары G–U на G–C. Другая MutY-зависимая система репарации специфически ликвидирует последствия окислительных повреждений гуанина. Если dGTP окисляется с образованием 8-оксо-dGTP, белок MutT расщепляет последний, предотвращая его включение в ДНК. Если же он все-таки включается напротив остатка C, то Fpg-гликозилаза (MutM) удаляет это модифицированное основание. В том случае, когда 8-оксо-G остается в составе ДНК, в следующем раунде репликации он спаривается с A, и в итоге может произойти трансверсия G–C>T–A. В этом случае белок MutY действует как ДНК-гликозилаза, удаляющая остаток A из некорректной пары, и как AP-лиаза, вносящая одноцепочный разрыв по соседству с AP-сайтом.

Далее следуют процессы, уже рассмотренные выше в связи с функционированием системы репарации BER. Последовательность реакций с участием MutY также репарирует некомплементарные пары А–G и А–С с образованием соответственно пар С–G и G–С.

Вопросы для самоконтроля:

1. Дайте определение репарации.
2. Каковы основные механизмы репарации ДНК?
3. Фотореактивация.
4. Схематично объясните световую репарацию.
5. Эксцизионная репарация. В чем заключается многоэтапный процесс?
6. Какова причина образования деградации поврежденной спирали?
7. Пострепликативная репарация.

6. МЕТОДЫ РЕПЛИКАЦИИ ДНК

Вся информация о строении и функционировании любого организма содержится в закодированном виде в его генетическом материале, основу которого у подавляющего числа организмов составляет ДНК. Роль ДНК заключается в хранении и передаче генетической (наследственной) информации в живых организмах. Чтобы эта информация могла передаваться от одного поколения клеток (и организмов) к другому, необходимо её точное копирование и последующее распределение её копий между потомками. Процесс, с помощью которого создаются копии молекулы ДНК, называется репликацией. Перед тем как разделиться, клетки с помощью репликации создают копию своего генома, и в результате клеточного деления в каждую дочернюю клетку переходит одна копия. Благодаря этому, генетическая информация, содержащаяся в родительской клетке, не исчезает, а сохраняется и передаётся потомкам. В случае многоклеточных организмов передача этой информации осуществляется с помощью половых клеток, образующихся в результате мейотического деления и также несущих копию генома (гаплоидного). Их слияние приводит к объединению двух родительских геномов в одной клетке (зиготе). Из неё развивается организм, клетки которого несут генетическую информацию обоих родительских организмов. Таким образом, основное значение репликации заключается в снабжении потомства генетической информацией. Для обеспечения стабильности организма и вида ДНК должна реплицироваться полностью и с очень высокой точностью, что обеспечивается функционированием определённого набора белков. Замечательной особенностью ДНК является то, что она несёт гены кодирующие эти белки, и, таким образом, информация о механизме её собственного удвоения закодирована в ней самой.

6.1 Понятие и основа репликации

Репликация (позднелат. *replicatio* – повторение, от лат. *replico* – обращаюсь назад, повторяю), редупликация, ауторепродукция, аутосинтез, протекающий во всех живых

клетках процесс самовоспроизведения (самокопирования) нуклеиновых кислот, генов, хромосом.

Репликация ДНК – это процесс синтеза дочерней молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты, который происходит в процессе деления клетки на матрице родительской молекулы ДНК. При этом генетический материал, зашифрованный в ДНК, удваивается и делится между дочерними клетками. Репликацию ДНК осуществляет фермент ДНК-полимераза.

В основе механизма репликации лежит ферментативный синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или рибонуклеиновых кислот (РНК), осуществляемый по матричному принципу. Предложенная в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком модель строения ДНК – так называемая двойная спираль – с одной стороны, объяснила, каким образом записана генетическая информация в молекуле ДНК, с другой – позволила понять и экспериментально изучать химические механизмы удвоения генетического материала. Строгая специфичность спаривания азотистых оснований в молекуле ДНК обуславливает комплементарность последовательностей оснований в двух цепях и обеспечивает высокую точность. Пара гуанин – цитозин стабилизируется тремя водородными связями, пара аденин – тимин – двумя, что резко снижает вероятность неправильного спаривания оснований. Согласно Уотсону и Крику, процесс репликации ДНК предусматривает: 1) разрыв водородных связей и расплетение нитей двойной спирали; 2) синтез на одиночных нитях комплементарных цепей. В результате из одной двухцепочной ДНК возникают две подобные молекулы, причём в каждой из дочерних молекул одна полинуклеотидная цепь родительская, а другая – синтезированная заново (полуконсервативный механизм репликации).

У вирусов и фагов, имеющих однонитевую ДНК, репликация идёт особым образом. После внедрения в клетку хозяина одноцепочной ДНК, которую называют (+)-цепью, на ней, как на матрице, синтезируется комплементарная ей (–)-цепь. На образовавшейся двухспиральной молекуле (репликативная форма) синтезируются новые одноцепочные (+)-

цепи, включающиеся в новые вирусные частицы. По такому же принципу происходит репликация РНК-содержащих вирусов и фагов. Таким образом, во всех известных случаях репликация ДНК и РНК проходит через стадию двухцепочных молекул.

У высших организмов – эукариотов, клетки которых содержат сформированное ядро, основную генетическую функцию несут сложно организованные структуры – хромосомы, состоящие из ДНК, РНК, белков и других веществ. В интерфазе, предшествующей делению клеток (см. Митоз, Мейоз), осуществляется репликация ДНК и других компонентов хромосом; затем удвоенные хромосомы разъединяются и распределяются равномерно между дочерними клетками. Вся наследственная информация в относительно неизменном виде передаётся от клетки к клетке, от поколения к поколению.

Хеликаза, топоизомераза и ДНК-связывающие белки расплетают ДНК, удерживают матрицу в разведённом состоянии и вращают молекулу ДНК. Правильность репликации обеспечивается точным соответствием комплементарных пар оснований и активностью ДНК-полимеразы, способной распознать и исправить ошибку. Репликация у эукариот осуществляется несколькими разными ДНК-полимеразами. Далее происходит закручивание синтезированных молекул по принципу суперспирализации и дальнейшей компактизации ДНК. Синтез энергозатратный.

Цепи молекулы ДНК расходятся, образуя репликационную вилку, и каждая из них становится матрицей, на которой синтезируется новая комплементарная цепь. В результате образуются две новые двуспиральные молекулы ДНК, идентичные родительской молекуле.

Каждая молекула ДНК состоит из одной цепи исходной родительской молекулы и одной вновь синтезированной цепи. Такой механизм репликации называется полуконсервативным. В настоящее время этот механизм считается доказанным благодаря опытам Мэтью Мезельсона и Франклина Сталя (1958 г.). Ранее существовали и две другие модели: «консервативная» – в результате репликации одна молекула ДНК состоит только из родительских цепей, а другая – только из дочерних цепей;

«дисперсионная» – все получившиеся в результате репликации молекулы ДНК состоят из цепей, одни участки которых вновь синтезированы, а другие взяты из родительской молекулы ДНК).

Процесс редупликации: раскручивание спирали молекулы – отделение одной цепи от другой на части молекулы ДНК – воздействие фермента ДНК-полимеразы на молекулу – присоединение к каждой цепи ДНК комплементарных нуклеотидов – образование двух молекул ДНК из одной.

6.2. Процесс репликации ДНК

В процессе репликации двойная спираль ДНК, состоящая из двух комплементарных полинуклеотидных цепей, раскручивается на отдельные цепи и одновременно начинается синтез новых полинуклеотидных цепей, при этом исходные цепи ДНК играют роль матриц. Новая цепь, синтезирующаяся на каждой из исходных цепей, идентична другой исходной цепи. Когда процесс завершается, образуются две идентичные двойные спирали, каждая из которых состоит из одной старой (исходной) и одной новой цепи. Таким образом от одного поколения к другому передается только одна из двух цепей, составляющих исходную молекулу ДНК, – так называемый полуконсервативный механизм репликации.

Репликация состоит из большого числа последовательных этапов, которые включают узнавание точки начала репликации, расплетание исходного дуплекса (спирали), удержание его цепей в изолированном друг от друга состоянии, инициацию синтеза на них новых дочерних цепей, их рост (элонгацию), закручивание цепей в спираль и терминацию (окончание) синтеза. Все эти этапы репликации, протекающие с высокой скоростью и исключительной точностью, обеспечивает комплекс, состоящий более чем из 20 ферментов и белков, – так называемая ДНК-репликационная система, или реплисома. Функциональная единица репликации – репликон, представляющий собой сегмент (участок) хромосомы или внехромосомной ДНК, ограниченный точкой начала, в которой иницируется

репликация, и точкой окончания, в которой репликация останавливается. Скорость репликации контролируется на стадии инициации. Однажды начавшись, репликация продолжается до тех пор, пока весь репликон не будет дублирован (удвоен). Частота инициации определяется взаимодействием специальных регуляторных белков с точкой начала репликации. Бактериальные хромосомы содержат один репликон: инициации в единственной точке начала репликации ведет к репликации всего генома. В каждом клеточном цикле репликация иницируется только один раз. Плазмиды и вирусы, являющиеся автономными генетическими элементами, представляют собой отдельные репликоны, способные к многократной инициации в клетке-хозяине. Эукариотичные хромосомы (хромосомы всех организмов, за исключением бактерий и синезеленых водорослей) содержат большое число репликонов, каждый из которых также однократно иницируется за один клеточный цикл.

Начиная с точки инициации, репликация осуществляется в ограниченной зоне, перемещающейся вдоль исходной спирали ДНК. Эта активная зона репликации (т. н. репликац. вилка) может двигаться в обоих направлениях. При однонаправленной репликации вдоль ДНК движется одна репликационная вилка. При двунаправленной репликации от точки инициации в противоположных направлениях расходятся две репликационные вилки; скорости их движения могут различаться. При репликации ДНК бактерии и млекопитающих скорость роста дочерней цепи составляет соответственно 500 и 50 нуклеотидов в 1 с; у растений эта величина не превышает 20 нуклеотидов в 1 с. Движение двух вилок в противоположных направлениях создает петлю, которая имеет вид "пузыря" или "глаза". Продолжающаяся репликация расширяет "глаз" до тех пор, пока он не включит в себя весь репликон.

В ходе репликации рост цепи осуществляется благодаря взаимодействию дезоксирибонуклеозидтрифосфата с 3'-ОН концевым нуклеотидом уже построенной части ДНК; при этом отщепляется пирофосфат и образуется фосфодиэфирная связь. Рост полинуклеотидной цепи идет только с ее 3'-конца, т. е. в

направлении 5' : 3'. Фермент, катализирующий эту реакцию, – ДНК-полимераза.

Энергия, затрачиваемая на образование каждой новой фосфодиэфирной связи в цепи ДНК, обеспечивается расщеплением фосфатной связи между *a*- и *b*-фосфатными группами нуклеозидтрифосфата.

ДНК-полимераза имеет один центр связывания нуклеозидтрифосфата, общий для всех четырех нуклеотидов. Выбор из среды нуклеотида, основание которого комплементарно очередному основанию матрицы, протекает без ошибок, благодаря определяющему влиянию ДНК-матрицы (исходной цепи ДНК). При некоторых мутационных повреждениях структуры ДНК-полимеразы в ряде случаев происходит включение некомплементарных нуклеотидов.

В процессе репликации формальной ДНК на короткое время с вероятностью 10^{-4} – 10^{-5} возникают редкие таутомерные формы всех 4 азотистых оснований нуклеотидов, которые образуют неправильные пары. Высокая точность репликации (вероятность ошибок не превышает 10^{-9}) обусловлена наличием механизмов, осуществляющих коррекцию (репарацию).

Репликационная вилка асимметрична. Из двух синтезируемых дочерних цепей ДНК одна строится непрерывно, а другая – с перерывами. Первую называют ведущей, или лидирующей, цепью, а вторую – отстающей. Синтез второй цепи идет медленнее; хотя в целом эта цепь строится в направлении 3':5', каждый из ее фрагментов в отдельности наращивается в направлении 5':3'. Благодаря такому прерывистому механизму синтеза, репликация обеих антипараллельных цепей осуществляется с участием одного фермента-ДНК-полимеразы, катализирующего наращивание нуклеотидной цепи только в направлении 5':3'.

В качестве затравок для синтеза фрагментов отстающей цепи служат короткие отрезки РНК, комплементарные матричной цепи ДНК. Эти РНК-затравки (праймеры), состоящие примерно из 10 нуклеотидов, с определенными интервалами синтезируются на матрице отстающей цепи из рибонуклеозидтрифосфатов в направлении 5' : 3' с помощью

фермента РНК-праймазы. РНК-праймеры затем наращиваются дезоксинуклеотидами с 3'-конца ДНК-полимеразой, которая продолжает наращивание до тех пор, пока строящаяся цепь не достигает РНК-затравки, присоединенной к 5'-концу предыдущего фрагмента. Образующиеся таким образом фрагменты (т. н. фрагменты Оказаки) отстающей цепи насчитывают у бактерий 1000–2000 дезоксирибонуклеотидных остатков; в животных клетках их длина не превышает 200 нуклеотидов.

Чтобы обеспечить образование непрерывной цепи ДНК из многих таких фрагментов, в действие вступает особая система репарации ДНК, удаляющая РНК-затравку и заменяющая ее на ДНК. У бактерий РНК-затравка удаляется нуклеотид за нуклеотидом благодаря 5' : 3'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы. При этом каждый отщепленный рибонуклеотидный мономер замещается соответствующим дезоксирибонуклеотидом (в качестве затравки используется 3'-конец синтезированного на старой цепи фрагмента). Завершает весь процесс фермент ДНК-лигаза, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между группой 3'-ОН нового фрагмента ДНК и 5'-фосфатной группой предыдущего фрагмента. Образование этой связи требует затраты энергии, которая поставляется в ходе сопряженного гидролиза пирогосфатной связи кофермента-никотинамид-адениндинуклеотида (в бактериальных клетках) или АТФ (в животных клетках и у бактериофагов).

Раскручивание двойной спирали и пространственное разделение цепей осуществляется при помощи нескольких специальных белков. Геликазы расплетают короткие участки ДНК, находящиеся непосредственно перед репликационной вилкой. На разделение каждой пары оснований расходуется энергия гидролиза двух молекул АТФ до аденозиндифосфата и фосфата. К каждой из разделившихся цепей присоединяется несколько молекул ДНК-связывающих белков, которые препятствуют образованию комплементарных пар и обратному воссоединению цепей. Благодаря этому нуклеотидные последовательности цепей ДНК оказываются доступными для репликативной системы. Другие специфические белки

помогают праймазе получить доступ к матрице отстающей цепи. В результате праймаза связывается с ДНК и синтезирует РНК-затравки для фрагментов отстающей цепи. Для формирования новых спиралей не требуется ни затрат энергии, ни участия комплементарного "закручивающего" фермента.

В случае кольцевого репликона (напр., у плазмиды) описанный процесс называется *q*-репликацией. Кольцевые молекулы ДНК закручены сами на себя (суперспирализованы), при раскручивании двойной спирали в процессе репликации они должны непрерывно вращаться вокруг собственной оси. При этом возникает торсионное напряжение, которое устраняется путем разрыва одной из цепей. Затем оба конца сразу же вновь соединяются друг с другом. Эту функцию выполняет фермент ДНК-топоизомераза. Репликация в этом случае обычно происходит в двух направлениях, т. е. существуют две репликационные вилки. После завершения репликации появляются две двухцепочные молекулы, которые сначала связаны друг с другом как звенья одной цепи. При их разделении одно из двух колец временно разрывается.

Альтернативный вариант репликации кольцевого репликона предполагает разрыв в одной из цепей двухспиральной молекулы ДНК. Образовавшийся при этом свободный 3'-конец ковалентно наращивается, оставаясь связанным с матрицей (второй, неразорванной цепью), а 5'-конец постепенно вытесняется новой полинуклеотидной цепью. Таким образом, одна цепь разматывается и непрерывно удлиняется, а репликационная вилка скользит вокруг кольцевой матричной цепи (механизм "катящегося кольца"). По мере роста новой цепи вытесненная цепь с освободившимся 5'-концом становится линейной матрицей для синтеза новой комплементарной цепи. Этот синтез на линейной матрице продолжается до тех пор, пока не образуется дочерняя цепь ДНК, комплементарная одному обороту кольцевой матрицы, т. е. целому репликону. Таким путем с кольцевой матрицы может сходить большое число комплементарных копий. Такой механизм обнаружен у некоторых вирусов, а также в ряде клеток эукариот.

Еще одна схема репликации предполагает формирование структуры, названной D-петлей. Согласно этому механизму, сначала реплицируется только одна из цепей кольцевого репликона, тогда как вторая цепь, оставаясь интактной, вытесняется, образуя петлю. Репликация второй цепи начинается с другой стартовой точки и только после того, как реплицировалась часть первой цепи. Такой механизм репликации обнаружен, например у митохондриальных ДНК.

Репликация РНК (синтез РНК на РНК-матрице) изучена меньше. Она осуществляется только у некоторых вирусов (напр., у вирусов полиомиелита и бешенства). Фермент, катализирующий этот процесс – РНК-зависимая РНК-полимераза (его называют также РНК-репликазой или РНК-синтетазой). Известно несколько типов репликации, РНК:

1. Вирусы, содержащие матричные РНК, или мРНК [т. н. (+)РНК], в результате репликации образуют комплементарную ей цепь [(-)РНК], не являющуюся мРНК, которая используется как матрица для синтеза (+)РНК;

2. Вирусы, содержащие (-)РНК, в результате репликации синтезируют (+)РНК;

3. Вирусы, содержащие двухцепочную РНК [(+)РНК и (-)РНК], в результате асимметрической репликации синтезируют (+)РНК.

Гипотеза о механизме репликации сформулирована в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком, которые предположили, что две комплементарные цепи ДНК после их разделения могут выполнять функции матриц для образования на них новых цепей ДНК. В 1958 г. М. Мезельсон и Ф. Сталь экспериментально подтвердили такой механизм репликации.

6.3. Основные ферменты репликации ДНК

ДНК-полимераза – фермент, участвующий в репликации ДНК. Ферменты этого класса катализируют полимеризацию дезоксирибонуклеотидов вдоль цепочки нуклеотидов ДНК, которую фермент «читает» и использует в качестве шаблона. Тип нового нуклеотида определяется по принципу ком-

плементарности с шаблоном, с которого ведётся считывание. Собираемая молекула комплементарна шаблонной моноспирали и идентична второму компоненту двойной спирали.

Выделяют ДНК-зависимую ДНК-полимеразу, использующую в качестве матрицы одну из цепей ДНК, и РНК-зависимую ДНК-полимеразу, способную также к считыванию информации с РНК (обратная транскрипция).

ДНК-полимеразу считают холоферментом, поскольку для нормального функционирования она требует присутствия ионов магния в качестве кофактора. В отсутствии ионов магния о ней можно говорить как об апоферменте.

ДНК-полимераза начинает репликацию ДНК, связываясь с отрезком цепи нуклеотидов. Среднее количество нуклеотидов, присоединяемое ферментом ДНК-полимеразой за один акт связывания/диссоциации с матрицей, называют процессивностью.

Лигаза – фермент, катализирующий соединение двух молекул с образованием новой химической связи (лигирование). При этом обычно происходит отщепление (гидролиз) небольшой химической группы от одной из молекул. Лигазы относятся к классу ферментов ЕС 6.

В молекулярной биологии лигазы разделяют на две большие группы – РНК-лигазы и ДНК-лигазы. ДНК-лигаза, осуществляющая репарацию ДНК.

ДНК-лигазы – ферменты, катализирующие ковалентное сшивание цепей ДНК в дуплексе при репликации, репарации и рекомбинации. Они образуют фосфодиэфирные мостики между 5'-фосфорильной и 3'-гидроксильной группами соседних дезоксирибонуклеотидов в местах разрыва ДНК или между двумя молекулами ДНК. Для образования этих мостиков лигазы используют энергию гидролиза пирофосфорильной связи АТФ. Один из самых распространённых коммерчески доступных ферментов – ДНК-лигаза бактериофага Т4.

ДНК геликазы – ферменты раскручивающие двуцепочечную спираль ДНК с затратой энергии гидролиза трифосфатов NTP. Образованная одноцепочечная ДНК участвует в различных процессах, таких как репликация, рекомбинация, и репарация. ДНК геликазы необходимы для репликации, репарации, реком-

бинации и транскрипции. Геликазы присутствуют во всех организмах.

ДНК-топоизомеразы – ферменты, изменяющие степень сверхспиральности и тип сверхспирали. Путём одноцепочного разрыва они создают шарнир, вокруг которого нереплетицированный дуплекс ДНК, находящейся перед вилкой, может свободно вращаться. Это снимает механическое напряжение, возникающее при раскручивании двух цепей в репликативной вилке, что является необходимым условием для её непрерывного движения. Кроме того, топоизомеразы (типа II) обеспечивают разделение или образование катенанов – сцепленных кольцевых ДНК (образуются в результате репликации кольцевой ДНК), а также устранение узлов и спутанных клубков из длинной линейной ДНК. Существует два типа топоизомераз. Топоизомеразы типа I уменьшают число сверхвитков в ДНК на единицу за один акт. Эти топоизомеразы надрезают одну из двух цепей, в результате чего фланкирующие дуплексные области могут повернуться вокруг интактной цепи, и затем воссоединяют концы разрезанной цепи. Эта реакция не требует энергии АТФ, т. к. энергия фосфодиэфирной связи сохраняется благодаря тому, что тирозиновый остаток в молекуле фермента выступает то в роли акцептора, то в роли донора фосфорильного конца разрезанной цепи.

Топоизомеразы типа II вносят временные разрывы в обе комплиментарные цепи, пропускают двухцепочный сегмент той же самой или другой молекулы ДНК через разрыв, а затем соединяют разорванные концы. В результате за один акт снимаются два положительных или отрицательных сверхвитка. Топоизомеразы типа II тоже используют тирозиновые остатки для связывания 5-конца каждой разорванной цепи в то время, когда другой дуплекс проходит через место разрыва.

Праймаза – фермент, обладающий РНК-полимеразной активностью; служит для образования РНК-праймеров, необходимых для инициации синтеза ДНК в точке *ori* и дальнейшем для синтеза отстающей цепи.

Вопросы для самоконтроля:

1. Понятие репликации.
2. Как происходит репликация ДНК у вирусов и фагов?
3. Что с собой представляет процесс редупликации?
4. Из каких этапов состоит процесс репликации ДНК?
5. Как осуществляется раскручивание двойной спирали?
6. Кратко охарактеризуйте ферменты, участвующие в репликации ДНК.

7. РАСШИФРОВКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА ЧЕЛОВЕКА

7.1. Понятие генетического кода

Генетический код – свойственная живым организмам единая система записи наследственной информации в молекулах нуклеиновых кислот в виде последовательности нуклеотидов. Каждый нуклеотид обозначается заглавной буквой, с которой начинается название азотистого основания, входящего в его состав: - А (А) аденин; - Г (G) гуанин; - Ц (C) цитозин; - Т (T) тимин (в ДНК) или У (U) урацил (в мРНК).

Реализация генетического кода в клетке происходит в два этапа: транскрипцию и трансляцию.

Первый из них протекает в ядре; он заключается в синтезе молекул и-РНК на соответствующих участках ДНК. При этом последовательность нуклеотидов ДНК "переписывается" в нуклеотидную последовательность РНК. Второй этап протекает в цитоплазме, на рибосомах; при этом последовательность нуклеотидов и-РНК переводится в последовательность аминокислот в белке: этот этап протекает при участии транспортной РНК (т-РНК) и соответствующих ферментов.

7.2. Свойства генетического кода

1. Триплетность. Каждая аминокислота кодируется последовательностью из 3-х нуклеотидов.

Триплет или кодон – последовательность из трех нуклеотидов, кодирующая одну аминокислоту.

Код не может быть моноплетным, поскольку 4 (число разных нуклеотидов в ДНК) меньше 20. Код не может быть дуплетным, т. к. 16 (число сочетаний и перестановок из 4-х нуклеотидов по 2) меньше 20. Код может быть триплетным, т. к. 64 (число сочетаний и перестановок из 4-х по 3) больше 20.

2. Вырожденность. Все аминокислоты, за исключением метионина и триптофана, кодируются более чем одним триплетом: 2 аминокислоты по 1 триплету = 2 9 аминокислот по 2 триплета = 18 1 аминокислота 3 триплета = 3 5 аминокислот

по 4 триплета = 20 3 аминокислоты по 6 триплетов = 18 Всего 61 триплет кодирует 20 аминокислот.

3. Наличие межгенных знаков препинания. Ген – это участок ДНК, кодирующий одну полипептидную цепь или одну молекулу тРНК, рРНК или sРНК. Гены тРНК, рРНК, sРНК белки не кодируют.

В конце каждого гена, кодирующего полипептид, находится, по меньшей мере, один из 3-х завершающих кодонов, или стоп-сигналов: UAA, UAG, UGA. Они завершают трансляцию.

<u>GCU</u> Ala	<u>GCU</u> Ala	<u>GCU</u> Ala	<u>GCU</u> Ala	<u>GCU</u> Ala	<u>GCU</u> Ala	<u>GCU</u> Ala	Дикий тип
<u>GCU</u> Ala	<u>GCU</u> Ala	<u>AGC</u> Ser	<u>UGC</u> Cys	<u>UGC</u> Cys	<u>UGC</u> Cys	<u>UGC</u> Cys	Вставка (+1)
<u>GCU</u> Ala	<u>GCU</u> Ala	<u>GCU</u> Ala	<u>GCU</u> Ala	<u>CUG</u> Leu	<u>CUG</u> Leu	<u>CUG</u> Leu	Делеция (-1)
<u>GCU</u> Ala	<u>GCU</u> Ala	<u>AGC</u> Ser	<u>UGC</u> Cys	<u>UCU</u> Ser	<u>GCU</u> Ala	<u>GCU</u> Ala	Двойной мутант (+1, -1)
<u>GCU</u> Ala	<u>GAC</u> Asp	<u>UGC</u> Cys	<u>AUG</u> Met	<u>CUG</u> Leu	<u>CAU</u> His	<u>GCU</u> Ala	Тройной мутант (3 по +1)
<u>GCU</u> Ala	<u>CUG</u> Leu	<u>CUC</u> Leu	<u>UGC</u> Cys	<u>UCU</u> Ser	<u>GCU</u> Ala	<u>GCU</u> Ala	Тройной мутант (3 по -1)

Рис. 13. Эксперимент Сеймур Бензера и Френсис Крика

Условно к знакам препинания относится и кодон AUG – первый после лидерной последовательности. Он выполняет функцию заглавной буквы. В этой позиции он кодирует формилметионин (у прокариот).

4. Однозначность. Каждый триплет кодирует лишь одну аминокислоту или является терминатором трансляции.

Исключение составляет кодон AUG. У прокариот в первой позиции (заглавная буква) он кодирует формилметионин, а в любой другой – метионин.

5. Компактность, или отсутствие внутригенных знаков препинания.

Внутри гена каждый нуклеотид входит в состав значащего кодона.

В 1961 г. Сеймур Бензер и Френсис Крик экспериментально доказали триплетность кода и его компактность.

Суть эксперимента: "+" мутация – вставка одного нуклеотида. "-" мутация – выпадение одного нуклеотида. Одиочная "+" или "-" мутация в начале гена портит весь ген. Двойная "+" или "-" мутация тоже портит весь ген. Тройная "+" или "-" мутация в начале гена портит лишь его часть. Четверная "+" или "-" мутация опять портит весь ген.

Эксперимент доказывает, что код триплетен и внутри гена нет знаков препинания. Эксперимент был проведен на двух рядом расположенных фаговых генах и показал, кроме того, наличие знаков препинания между генами.

7.3. Генетическая информация

Генетическая информация – программа свойств организма, получаемая от предков и заложенная в наследственных структурах в виде генетического кода.

Предполагается, что становление генетической информации шло по схеме: геохимические процессы – минералообразование – эволюционный катализ (автокатализ).

Возможно, что первые примитивные гены представляли собой микрокристаллические (кристаллы) глины, причем каждый новый слой глины выстраивается в соответствии с особенностями строения предыдущего, как бы получая от него информацию о строении.

Реализация генетической информации происходит в процессе синтеза белковых молекул с помощью трех РНК: информационной (иРНК), транспортной (тРНК) и рибосомальной (рРНК). Процесс передачи информации идет: - по каналу

прямой связи: ДНК - РНК - белок; и - по каналу обратной связи: среда - белок - ДНК.

Живые организмы способны получать, сохранять и передавать информацию. Причем живым организмам присуще стремление полученную информацию о себе и окружающем мире использовать максимально эффективно. Наследственная информация, заложенная в генах и необходимая живому организму для существования, развития и размножения передается от каждого индивида его потомкам. Эта информация определяет направление развития организма, и в процессе взаимодействия его с окружающей средой реакция на ее индивида может искажаться, обеспечивая тем самым эволюцию развития потомков. В процессе эволюции живого организма возникает и запоминается новая информация, в т. ч. для него возрастает ценность информации.

В ходе реализации наследственной информации в определенных условиях внешней среды формируется фенотип организмов данного биологического вида.

Генетическая информация определяет морфологическое строение, рост, развитие, обмен веществ, психический склад, предрасположенность к заболеваниям и генетические пороки организма.

Многие ученые, справедливо подчеркивая роль информации в становлении и эволюции живого, отмечали это обстоятельство в качестве одного из главных критериев жизни. Так, В. И. Карагодин считает: "Живое есть такая форма существования информации и кодируемых ею структур, которая обеспечивает воспроизведение этой информации в подходящих условиях внешней среды". Связь информации с жизнью отмечает и А. А. Ляпунов: "Жизнь – это высокоупорядоченное состояние вещества, использующее для выработки сохраняющихся реакций информацию, кодируемую состояниями отдельных молекул". Известный наш астрофизик Н. С. Кардашев также подчеркивает информационную составляющую жизни: "Жизнь возникает благодаря возможности синтеза особого рода молекул, способных запоминать и использовать вначале самую простую информацию об окружающей среде и собственной

структуре, которую они используют для самосохранения, для воспроизводства и, что для нас особенно важно, получения еще большего количества информации". На эту способность живых организмов сохранять и передавать информацию обращает внимание в своей книге "Физика бессмертия" эколог Ф. Типлер: "Я определяю жизнь как некую закодированную информацию, которая сохраняется естественным отбором". Более того, он считает, если это так, то система жизнь – информация является вечной, бесконечной и бессмертной.

Раскрытие генетического кода и установление закономерностей молекулярной биологии показали необходимость соединения современной генетики и дарвиновской теории эволюции. Так родилась новая биологическая парадигма – синтетическая теория эволюции (СТЭ), которую можно рассматривать уже как неклассическую биологию.

Основные идеи эволюции Дарвина с его триадой – наследственностью, изменчивостью, естественным отбором – в современном представлении эволюции живого мира дополняются представлениями не просто естественного отбора, а такого отбора, который детерминирован генетически. Началом разработки синтетической или общей эволюции можно считать работы С. С. Четверикова по популяционной генетике, в которых было показано, что отбору подвергаются не отдельные признаки и особи, а генотип всей популяции, но осуществляется он через фенотипические признаки отдельных особей. Это приводит к распространению полезных изменений во всей популяции. Таким образом, механизм эволюции реализуется как через случайные мутации на генетическом уровне, так и через наследование наиболее ценных признаков (ценности информации), определяющих адаптацию мутационных признаков к окружающей среде, обеспечивая наиболее жизнеспособное потомство.

Сезонные изменения климата, различные природные или техногенные катастрофы с одной стороны, приводят к изменению частоты повторяемости генов в популяциях и, как следствие, к снижению наследственной изменчивости. Этот

процесс иногда называют дрейфом генов. А с другой – к изменениям концентрации различных мутаций и уменьшению разнообразия генотипов, содержащихся в популяции, что может привести к изменениям направленности и интенсивности действия отбора.

7.4. Расшифровка генетического кода человека

В мае 2006 г. учёные, работающие над расшифровкой генома человека, опубликовали полную генетическую карту хромосомы 1, которая была последней из не полностью секвенсированной хромосомой человека.

Предварительная генетическая карта человека была опубликована в 2003 г., что ознаменовало формальное завершение проекта Human Genome. В его рамках были секвенсированы фрагменты генома, содержащие 99 % генов человека. Точность идентификации генов составила 99,99 %. Однако на момент завершения проекта полностью секвенсированы были лишь четыре из 24 хромосом. Дело в том, что помимо генов хромосомы содержат фрагменты, не кодирующие никаких признаков и не участвующие в синтезе белков. Роль, которую эти фрагменты играют в жизни организма пока остается неизвестной, но все больше исследователей склоняются к мнению, что их изучение требует самого пристального внимания.

Завершающая часть работы по секвенсированию генома человека заняла у учёных около трёх лет. Расшифровка хромосомы 1 потребовала наибольшего времени, поскольку эта хромосома – самая длинная во всем геноме. Она в шесть раз длиннее самых коротких хромосом (21, 22 и Y). В ней находится около 8 % генетического кода: 3141 ген и 991 псевдоген, причем многие кодирующие последовательности перекрываются. Мутации и нарушения в хромосоме ответственны за возникновение более чем 350 заболеваний, включая рак. Так что важность публикации полной карты этой хромосомы сложно переоценить.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что собой представляет генетический код? Каковы этапы реализации генетического кода в клетке?
2. Дайте краткую характеристику свойствам генетического кода.
3. Принцип генетической трансформации.
4. Схема становления генетической трансформации. Дайте характеристику каждому этапу.
5. Расшифровка генетического кода человека.

8. ПЦР-ДИАГНОСТИКА

ДНК-диагностика – это один из наиболее современных высокотехнологичных методов исследования. ДНК-анализы широко применяются в диагностике инфекционных заболеваний, позволяя обнаруживать даже единичные микроорганизмы в организме человека.

ДНК-диагностика объединяет несколько методов исследования, самый распространенный из них – метод ПЦР (полимеразной цепной реакции, Polymerase chain reaction, PCR diagnostics).

На сегодняшний день ПЦР-анализ является одной из наиболее распространенных и динамично развивающихся технологий лабораторной диагностики. Ежегодно на рынке появляется все больше тест-систем, предназначенных для выявления как возбудителей различных заболеваний, так и мутаций генов человека, животных и растений. Количество ПЦР-лабораторий неуклонно увеличивается, а ПЦР-анализ становится все более востребованным среди специалистов и пациентов.

Первоначально сам принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) был разработан Кэри Мюллісом в 1983 г. Открытие ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние 20 лет, и за разработку ПЦР-анализа Кэрри Мюлліс уже в 1993 г. был удостоен Нобелевской премии в области химии.

Появлению метода проведения полимеразной цепной реакции предшествовали определенные достижения молекулярной генетики: к тому времени уже были расшифрованы нуклеотидной последовательности геномов ряда микроорганизмов и выделены специфические.

Также появлению ПЦР много способствовало открытие уникального фермента ДНК-полимеразы (или taq-полимеразы). Именно этот фермент катализирует и "контролирует" все процессы во время проведения анализа методом ПЦР. Особенность этого фермента – он термостабилен, исключительно термостоек: он выдерживает нагревание до температуры

кипения без потери активности, а его температурный режим во время работы – 72 °С. Многие реакции при проведении ПЦР идут почти исключительно при повышенной температуре.

За прошедшие 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. Одним из существенных преимуществ метода ПЦР является высокая чувствительность и специфичность. Чувствительность определяется сочетанием следующих трех факторов: эффективностью выделения ДНК возбудителя, чувствительностью собственно ПЦР и выбранного метода детекции.

8.1. Основной принцип ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод амплификации ДНК в условиях *in vitro*. Термином амплификация обозначают процесс многократно повторяющихся актов синтеза определенных последовательностей ДНК с использованием термостабильных ДНК-полимераз (Tag-pol, Tfh-pol, Pwu-pol) и специфичных в отношении искомого генома олигонуклеотидных последовательностей размером 17–30 нуклеотидных остатков (н.о.), называемых праймерами. Праймеры конструируют путем сравнения ряда геномных последовательностей и выбора наиболее консервативных участков, специфичных в отношении данного генома. Для амплификации искомого фрагмента ДНК подбирают пару праймеров, ограничивающих (фланкирующих) нужный участок нуклеотидной последовательности.

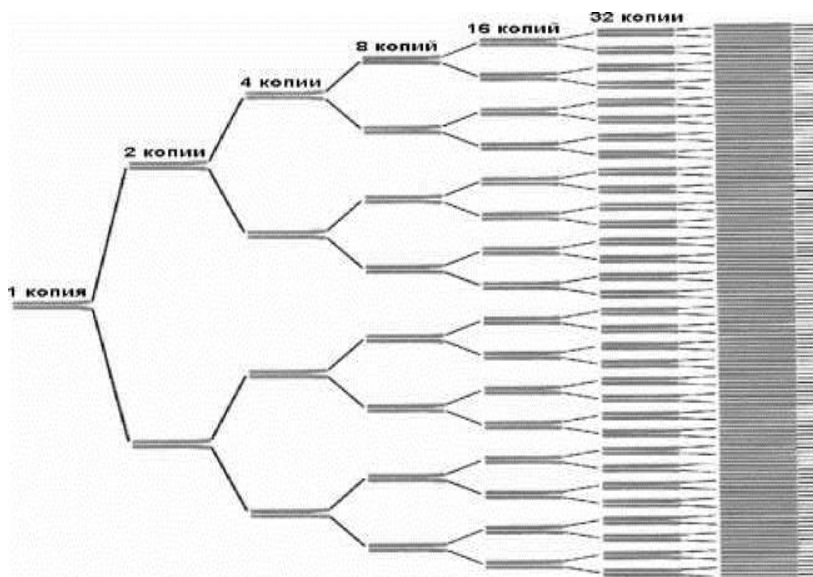


Рис. 14. Полимеразная цепная реакция – метод амплификации ДНК в условиях *in vitro*. В процессе ПЦР происходит экспоненциальное увеличение числа копий ДНК

Для того, чтобы провести наработку нужной последовательности, используя в качестве матрицы мРНК, необходимо получить ее ДНК-копию. Для этих целей используют реакцию обратной транскрипции (ОТ), осуществляемую РНК-зависимой ДНК-полимеразой, называемой также ревертаза или обратная транскриптаза. В настоящее время для этих целей используют три ревертазы: AMV из вируса миелобластома птиц, М-MuLV из вируса лейкемии мышей и термостабильную ДНК-полимеразу Tth, обладающую ревертазой активностью, из термофильных бактерий. Используя в качестве затравок или специфические праймеры или случайные последовательности (статистические затравки), ревертаза, согласно принципу комплементарности нуклеотидных оснований, синтезирует ДНК на матрице РНК. В результате получается комплементарная ДНК (кДНК), которую используют на следующем этапе анализа – амплификации фрагмента ДНК с использованием ПЦР.

Процесс амплификации ДНК заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК (93–95 °С), отжига (гибридизации) праймеров (50–65 °С) и удлинения цепи (72 °С) – достройки праймеров ДНК-полимеразой на матрице ДНК согласно принципу комплементарности нуклеотидных оснований. В течение 30–40 циклов происходит экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК по формуле 2^n (n – число прошедших циклов амплификации), т. е. в 10^8 раз, по сравнению с исходным.

В первом цикле происходит следующее: сначала ДНК расплетается на две цепочки при температуре 93–95 °С градусов в течение 30–40 секунд. Затем температура специально снижается до 50–65 °С градусов. При такой температуре нити ДНК ещё не могут заплестись обратно, а вот праймеры-образцы могут к ним присоединиться.

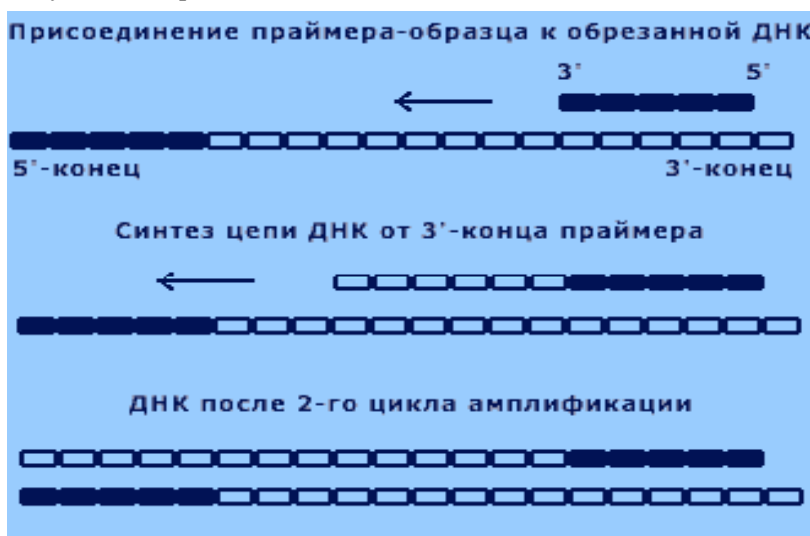


Рис. 15. Молекулярные события в первом цикле ПЦР

Присоединяться нуклеотиды могут только к 3'-концу цепочки, поэтому новая цепь ДНК будет не копией исходной, а обрезанной с одной стороны в том месте, где к исходной присоединится праймер. Нуклеотиды присоединяются лучше

всего при температуре в пробирке 72 °С градуса (оптимум работы Таq-полимеразы) в течение 20–40 секунд.

К началу второго цикла амплификации в пробирке останутся неиспользованные праймеры-образцы, неразрушившаяся Таq-полимераза, свободные нуклеотиды и двойные молекулы ДНК, одна из цепочек которых больше другой.

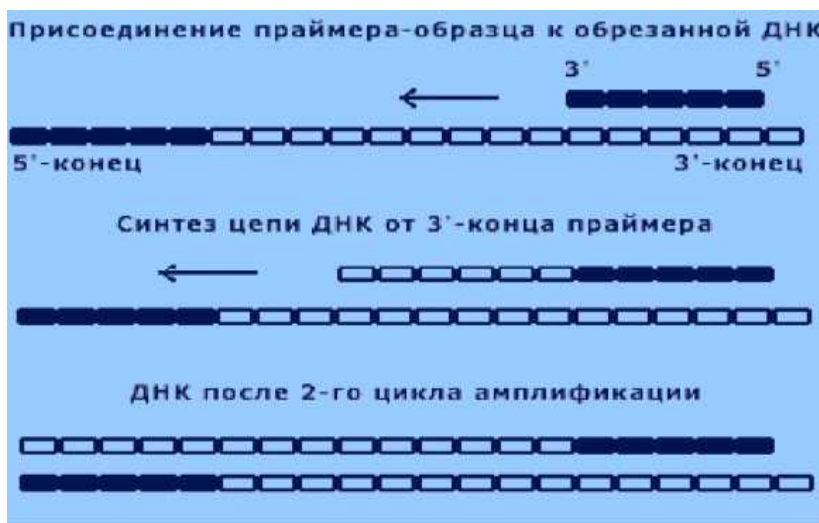


Рис. 16. Молекулярные события во втором раунде ПЦР

Второй раунд снова начинается с денатурации ДНК. При этом образуются разные виды цепочек. Одни из них будут равноценны исходным. С ними будет происходить то же, что и на первом цикле амплификации. Второй вид цепочек – короткий. С одной стороны они ограничены первым праймером-образцом. Так как никаких РНК-затравок в растворе нет и к 3'-концу исходной короткой цепочки может присоединиться только 5'-конец второго праймера-образца, то он туда и присоединяется. А дальше к нему присоединяются свободные нуклеотиды и цепочка удлиняется до тех пор, пока матричная ДНК не кончится.

К началу третьего цикла амплификации в растворе продолжают оставаться неиспользованные праймеры-образцы, неразрушившаяся Taq-полимераза, свободные нуклеотиды и двойные молекулы ДНК. Теперь существует два вида молекул ДНК: 1 вид – тот же самый, что и по завершению первого цикла амплификации – одна цепочка исходная, другая – обрезанная с одной стороны; 2 вид – одна цепочка, обрезанная с одной стороны, вторая – обрезанная с двух сторон. Именно она нам и нужна. Эта цепочка называется ампликоном и является целью ПЦР. Длина ампликона обычно составляет несколько сот нуклеотидов. В последующих циклах амплификации будут также синтезироваться два вида неполных ДНК и много полных ДНК, в которых обе цепочки равны друг другу по длине и ограничены с обеих сторон праймерами-образцами. "Обрезания" не происходит потому, что праймеры присоединяются к самым концам цепочек.

Количество ампликонов растёт в растворе экспоненциально, то есть по формуле 2^n , где n – количество циклов амплификации. Так как на один цикл амплификации затрачивается от 1 минуты 10 секунд до 2 минут 20 секунд, то из одной молекулы ДНК через час после начала синтеза будет образовано от 55 миллионов ампликонов до 3×10^{15} . Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции полученного фрагмента методом электрофореза в агарозном геле.

ПЦР обычно проводят в автоматическом режиме, используя для этого специальные приборы – термоциклеры или амплификаторы ДНК. Такой прибор позволяет задавать нужное количество циклов и выбирать оптимальные временные и температурные параметры для каждой процедуры цикла из большой и часто непрерывной шкалы возможных вариантов.

В техническом исполнении ПЦР очень проста. Все компоненты реакции – матричную ДНК, праймеры, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) и термофильную ДНК-полимеразу – добавляют в специфический буфер (часто одномоментно), наслаивают небольшой объем вазелинового масла для предотвращения высыхания реакционной смеси, затем пробирку в автоматический термоциклер и выбирают

необходимую программу циклической смены температуры и длительности каждого шага реакции. Общий объем реакционной смеси обычно составляет от 10 до 100 мкл. Выбор оптимального режима работы определяется длиной и специфичностью амплифицируемого участка.

С помощью ПЦР можно непосредственно исследовать места предполагаемых мутаций или полиморфных сайтов, а также изучать наличие любых других специфических особенностей ДНК. В качестве источника матричной ДНК может быть использован любой, даже деструктурированный биологический материал, сохранивший в своем составе достаточно полный набор фрагментов исходных молекул ДНК. Для специфической амплификации наряду с очищенной ДНК используют высушенные на фильтровальной бумаге пятна крови, небольшие кусочки тканей, смывы с полости рта и смывы с других слизистых поверхностей и т. д.

Существуют различные модификации ПЦР, применение которых зависит от конкретных целей проведения реакции или от характера последующего молекулярного анализа амплификатов. Так, для трудно амплифицируемых участков ДНК, содержащих различные повторяющиеся последовательности или необычные структурные элементы, а также в тех случаях, когда матричная ДНК присутствует в следовых количествах, ПЦР проводят в два этапа, используя в качестве матричной ДНК на втором этапе амплификации продукты ПЦР, синтезированные на первом этапе.

Двухраундовая ПЦР может быть реализована в двух вариантах — «гнездовом» или «nested» варианте, когда во втором раунде используют дополнительную внутреннюю пару праймеров, и в «полугнездовом» или «semynested» варианте, когда используют дополнительно один внутренний праймер. Следует отметить, что применение двухраундовой ПЦР повышает чувствительность и специфичность метода, однако «гнездовые» праймеры не очень пригодны для рутинных процедур, поскольку манипуляции с ПЦР-амплифицированной ДНК перед второй амплификацией повышают вероятность ее загрязнения.

В ряде случаев удобно проводить мультиплексную ПЦР, т. е. одновременную амплификацию нескольких участков матричной ДНК.

Благодаря постоянному совершенствованию метода (особый подбор праймеров, использование сразу двух различных ДНК-полимераз, трицинового бцфера, специального температурного режима полимеразных циклов и др.) возможно проведение амплификации фрагментов ДНК, достигающих 35 тыс. пар оснований.

Возможность очень точного и специфического выбора участка ДНК для амплификации, небольшие размеры синтезируемых молекул, их огромное количество чрезвычайно облегчают молекулярный анализ продуктов ПЦР. Как правило, амплифицированную ДНК можно непосредственно наблюдать в проходящем ультрафиолетовом свете в виде красной полосы после электрофоретического концентрирования и обычного окрашивания бромидом этидия. При наличии сайтов рестрикции в амплифицированных участках ДНК после их обработки эндонуклеазами и электрофореза количество и положение окрашенных полос на геле изменяется в соответствии с положением этих сайтов. С помощью электрофореза могут быть выявлены небольшие отклонения в размерах синтезированных молекул, которые возникают за счет делеций или инсерций нескольких нуклеотидов в исходной матричной молекуле ДНК.

Наконец возможно определение полной нуклеотидной последовательности синтезированной молекулы с идентификацией всех мутаций в исследуемом районе матричной ДНК. Разработаны варианты ПЦР, при которых синтезируются преимущественно одонитевые фрагменты ДНК, что в последующем значительно облегчает их секвенирование. Таким образом, метод ПЦР стал одним из основных в молекулярной диагностике различных заболеваний, в т. ч. и идентификации генетически обусловленных заболеваний.

Разработаны и широко используются в практике различные варианты метода, позволяющие быстро и эффективно идентифицировать мутации, изучать ДНК-полиморфизмы, применяемые для молекулярного маркирования мутантных хромосом.

8.2. Типовые ошибки при диагностике методом ПЦР

Все большее развитие получает лабораторная диагностика на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) благодаря своей скорости и высокой чувствительности. Однако, несмотря на простоту и удобство метода, существует ряд условий, невыполнение которых может привести к получению недостоверного или ложного результата.

Простой на первый взгляд метод имеет ряд "подводных камней", с которыми так или иначе приходится сталкиваться практически каждому специалисту лаборатории. К различным ошибкам могут приводить как отсутствие опыта в использовании данной методики, так и стереотипы мышления персонала, ранее работавшего в биохимических или бактериологических лабораториях, где иные требования к работе. В результате таких ошибок могут быть получены ложноположительные, ложноотрицательные или недостоверные результаты анализов.

С точки зрения получения ложноотрицательного или ложноположительного результата особенно опасны ошибки, контроль которых невозможно осуществить во время проведения ПЦР-анализа, — прежде всего, связанные с нарушением правил взятия, хранения и транспортировки клинического материала. Однако при диагностике могут допускаться и другие ошибки, которые могут быть не замечены сотрудником КДЛ при анализе результатов.

Все ошибки, допускаемые в лабораторной практике, можно разделить на три класса:

- ~ ошибки преаналитического этапа;
- ~ ошибки аналитического этапа;
- ~ ошибки постаналитического этапа.

1. Ошибки преаналитического этапа ПЦР-диагностики.

Операции преаналитического этапа ПЦР-диагностики выполняются вне ПЦР-лабораторий, однако ошибки, допускаемые на этом этапе, оказывают едва ли не самое существенное влияние на результат исследования. Большинство этих ошибок невозможно выявить в ходе исследования, и,

следовательно, существенно возрастает риск получения ложного результата. В связи с этим необходима совместная работа с различными подразделениями ЛПУ по разработке алгоритма взятия биоматериала и контроль его выполнения.

Взятие биологического материала.

Первой и самой существенной ошибкой преаналитического этапа ПЦР-диагностики является неправильный выбор места взятия биологического материала для исследования. Поскольку метод ПЦР является прямым, т. е. позволяет непосредственно выявить причину заболевания, а данным случае обнаружить патогенный микроорганизм, то биоматериал необходимо брать непосредственно в месте предполагаемой локализации инфекционного процесса. Исследование некоего "универсального материала", как, например, крови, не позволит определить наличие в организме патогена во всех случаях, за исключением тех, при которых возбудитель локализован именно в крови. В первую очередь это относится к патогенам, которые могут поражать многие органы и ткани, таким как, например, *Chlamydia trachomatis* или *Mycobacterium tuberculosis*.

Вторая ошибка на преаналитическом этапе – неправильное взятие материала на исследование.

Общими требованиями к биологическому материалу является максимальная концентрация микроорганизмов в образце, а также отсутствие нежелательных примесей, ингибирующих ПЦР.

Например, *Chlamydia trachomatis* – облигатные внутриклеточные паразиты, следовательно, исследуемый материал должен содержать большое количество клеток эпителия. То есть при взятии материала для выявления этих микроорганизмов необходимо делать соскоб, а не мазок, поскольку в мазке *Chlamydia trachomatis* не будут обнаружены, даже если находятся в организме в значительном количестве.

Обработка биологического материала. Правильное взятие урогенитального соскоба – процедура болезненная для лиц мужского пола и детей, поэтому для исследования можно использовать первую порцию утренней мочи, содержащую максимальное количество эпителия. В последующем для работы

необходимо получить клеточный осадок мочи. Однако следует учитывать, что осадок содержит большое количество солей и мочевины, которые при использовании технологий флуоресцентной детекции денатурируют зонды, что может привести к ложноположительным результатам. Поэтому клеточный осадок мочи необходимо в обязательном порядке промывать физиологическим раствором.

Следующая ошибка преаналитического этапа – неправильная обработка взятой крови. Для предотвращения свертываемости крови в процессе доставки необходимо использовать антикоагулянты. Во многих лабораториях в качестве антикоагулянта используется гепарин. Однако гепарин достаточно сильно ингибирует ПЦР, и независимо от используемой тест-системы и способа пробоподготовки все результаты для образца, его содержащего, окажутся недостоверными в случае наличия внутреннего контроля ПЦР или отрицательными, независимо от реального положения вещей в случае, если внутреннего контроля нет.

Хранение биологического материала. Необходимо помнить о температуре хранения биологического материала, а также сроках и способах его доставки в ПЦР-лабораторию в случае, если транспортировка требует значительного времени. При нарушении сроков хранения или транспортировки биоматериала ДНК или РНК возбудителя может разрушаться, что приведет к ложноотрицательным результатам. Образцы рекомендуется хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение нескольких часов, для более длительного хранения необходимо замораживание. Единственное исключение – кровь, поскольку цельную кровь замораживать нельзя! Необходимо получить плазму и уже ее замораживать. Заморозка должна быть однократной, в противном случае происходит разрушение нуклеиновых кислот.

2. Ошибки аналитического этапа ПЦР-диагностики. Ошибки аналитического этапа, как правило, связаны с невнимательным чтением инструкции, прилагаемой к набору для проведения ПЦР-анализа.

Одной из таких ошибок является неправильный выбор системы пробоподготовки. Менее опасно применение экспресс-методов для сложных биоматериалов – таких как, например, плазма крови, потому что в этом случае наиболее вероятно получение недостоверных результатов из-за оставшихся в пробе ингибиторов ПЦР, что, в свою очередь, вынудит специалиста КДЛ повторить эксперимент и выяснить причину неудачи. Гораздо опаснее, если из-за неправильно выбранной тест-системы в процессе пробоподготовки теряется часть или вся ДНК или РНК возбудителя – в этом случае есть риск получения ложноотрицательного результата.

Вторая ошибка – неправильно приготовленные фоновые пробы для тест-систем с флуоресцентной детекцией по конечной точке. Чаще всего это связано с тем, что сотрудник лаборатории забывает их менять при появлении новой серии реактивов или не делает этого из соображений экономии. Возможно, что одни и те же компоненты реакционной смеси едва ли будут иметь различный уровень флуоресценции, однако в разных сериях реактивов могут отличаться концентрации компонентов и поэтому высока вероятность различного уровня флуоресценции. Таким образом, ошибка, влияние которой в некоторых случаях можно не заметить, в других может обусловить большое количество недостоверных результатов.

Проблема контаминации возникает при неправильной организации работы лаборатории или при неаккуратном обращении с положительными образцами. Так, при использовании гель-электрофореза в качестве метода детекции комната для его проведения обязательно должна иметь отдельный вход и систему вентиляции. В противном случае вероятность того, что ампликоны из открывающихся пробирок будут попадать в другие помещения, очень высока. Это может привести к тому, что со временем все больше исследуемых образцов на часто встречающиеся инфекции будут оказываться положительными. При этом на первых этапах такого загрязнения отрицательный контроль может оставаться чистым, поскольку появление ложноположительных результатов носит статистический характер.

В случае флуоресцентной детекции пробирка не открывается и теоретически вероятность контаминации близка к нулю, однако возможность ее открытия не исключена. Поэтому лучше, если амплификация и детекция будут проводиться в отдельной комнате, тогда в случае непредвиденной ситуации контаминированной окажется одна комната.

Ошибки при интерпретации результата. При детекции с использованием гель-электрофореза есть риск принять неспецифические фрагменты за специфичные, если они близки по длине и нет возможности четко и однозначно сравнить с положительным контролем и, в идеале, с маркером длин.

В случае нарушений правил работы существует риск контаминации уже на этапе детекции. Такого рода контаминация отслеживается в случае, если полоса наблюдается в заведомо отрицательной пробе, однако она неотличима от контаминации в лаборатории и требует повторной проверки всех образцов.

Одной из ошибок интерпретации, связанной с использованием метода флуоресцентной детекции по конечной точке, является невнимательное отношение к нормировочным значениям фоновых пробирок и к значениям флуоресценции в отрицательных пробах. Так, при неправильном хранении зонды в фоновых пробирках могут разрушаться, и нормировочные значения существенно увеличиваются (от нескольких часов до нескольких дней), при этом значения флуоресценции в образцах оказываются в большей или меньшей степени занижены. Главным критерием достоверности полученных результатов в данном случае могут служить отрицательные пробы. При отсутствии расхождений между фоновыми и амплификационными пробирками отрицательные образцы имеют значения флуоресценции близкие к единице или, в редких случаях, чуть выше. Если значения флуоресценции в одном или нескольких образцах или отрицательном контроле существенно ниже единицы, с большой долей вероятности можно утверждать, что фоновые пробирки не соответствуют данному исследованию, в этом случае необходимо их поменять.

Наиболее частая ошибка при исследовании методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени связана с прибором, который при больших колебаниях флуоресценции может зафиксировать ложноположительные результаты.

В связи с этим необходимо проводить анализ индивидуальной кривой. Пороговая линия должна пересекать индивидуальную кривую и области начала экспоненциального роста, и это не один из множества пиков колебания флуоресценции. Также прибор может выдать ложноотрицательный результат в случае, если на первых циклах ПЦР по каким-то причинам произошло существенное уменьшение флуоресценции. Эту ошибку можно обнаружить при анализе исходных кривых флуоресценции. Если образец положительный, то на исходной кривой будет виден четкий экспоненциальный рост. Для большей достоверности можно сравнить такую сомнительную кривую с кривой заведомо положительной. Все положительные кривые имеют сходный угол наклона, и уровень флуоресценции при выходе на плато заметно отличается от колебаний в отрицательных образцах.

3. Ошибки постаналитического этапа ПЦР-диагностики. Ошибки на завершающем, постаналитическом этапе связаны с неверной интерпретацией врачом результатов ПЦР-анализа вследствие ошибочных представлений об инфекционном агенте или о возможностях метода.

Например, контрольное исследование на хламидиоз через 1 неделю после окончания курса антибиотиков даст положительный результат. Врач сделает вывод о неэффективности проведенной терапии. Однако окончательный вывод можно сделать не ранее чем через 4–6 недель, после того, как сменится эпителиальный слой, в котором паразитирует данный микроорганизм. Более ранняя диагностика может показать неверный результат, поскольку в клетках эпителия еще сохраняются погибшие микроорганизмы. Важно учитывать специфичность используемых тест-систем. Так, например, пациент с предполагаемым диагнозом "респираторный хламидиоз" направляется на исследование. При постановке ПЦР используется видоспецифическая тест-система для выявления

ДНК *S. Trachomatis*- результат исследования отрицательный. Однако врач не должен снимать предполагаемый диагноз, поскольку инфекция может быть вызвана другими видами хламидий, например *S. pneumoniae*, *S. pecorum*, *S. psittaci*, которые не диагностируются данной тест-системой. То есть при назначении ПЦР-исследования врач должен очень четко представлять границы специфичности применяемых тест-систем.

Вместе с тем несовпадение результатов различных методов исследования не говорит об ошибке. Зачастую ПЦР-исследование дает положительный результат, в то время как ИФА – отрицательный. Несовпадение результатов исследований может объясняться, например, периодом "серологического окна".

В случае обратных результатов исследований возможен "иммунологический след" – остаточный уровень антител, который у некоторых людей может сохраняться многие месяцы и даже годы после выздоровления, либо при проведении ПЦР не учитывается видоспецифичность тест-систем.

Приведенные примеры показывают, что для получения качественных результатов исследований необходимо четкое выполнение правил работы на всех этапах клинической лабораторной диагностики и тесная взаимосвязь специалистов ПЦР-лаборатории с врачами-клиницистами.

8.3. Преимущества метода ПЦР как метода диагностики инфекционных заболеваний

1. Прямое определение наличия возбудителей. Многие традиционные методы диагностики, например иммуноферментный анализ, выявляют белки-маркеры, являющиеся продуктами жизнедеятельности инфекционных агентов, что дает лишь опосредованное свидетельство наличия инфекции. Выявление специфического участка ДНК возбудителя методом ПЦР дает прямое указание на присутствие возбудителя инфекции.

2. Высокая специфичность. Высокая специфичность метода ПЦР обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется

уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов, в отличие от иммунологических методов анализа, где нередко ошибки в связи с перекрестно-реагирующими антигенами.

3. Высокая чувствительность. Метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. ПЦР-анализ обнаруживает наличие возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях, когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сделать невозможно. Чувствительность ПЦР-анализа составляет 10–100 клеток в пробе (чувствительность иммунологических и микроскопических тестов – 103–105 клеток).

4. Универсальность процедуры выявления различных возбудителей. Материалом для исследования методом ПЦР служит ДНК возбудителя. Метод основан на выявлении фрагмента ДНК или РНК, являющегося специфичным для конкретного организма. Сходство химического состава всех нуклеиновых кислот позволяет применять унифицированные методы проведения лабораторных исследований. Это дает возможность диагностировать несколько возбудителей из одной биопробы. В качестве исследуемого материала могут использоваться различные биологические выделения (слизь, моча, мокрота), соскобы эпителиальных клеток, кровь, сыворотка.

5. Высокая скорость получения результата анализа. Для проведения ПЦР-анализа не требуется выделение и выращивание культуры возбудителя, что занимает большое количество времени. Унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции и автоматизация процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4–5 часов.

6. Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций. Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм микроорганизмов, с которыми часто

приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, поскольку этот метод позволяет избежать сложностей, связанных с выращиванием таких микроорганизмов в лабораторных условиях. Применение ПЦР-диагностики также очень эффективно в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов.

Следует отметить, что методом ПЦР возможно выявление возбудителей не только в клиническом материале, полученном от больного, но и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва и т. д.).

8.4. Ограничения метода ПЦР

1. Амплифицируется ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма.

Это налагает определенные требования при использовании ПЦР для контроля эффективности лечения. В общем случае подобный контроль должен проводиться спустя промежуток времени, в течение которого происходит полная элиминация возбудителя. Обычно этот интервал составляет 4–8 недель.

2. Возможность перекрестной реакции. Подбор праймеров происходит на основе существующих знаний о геноме данного и сходных микроорганизмов. Теоретически существует возможность присутствия такого же фрагмента и у других микроорганизмов, геном которых в настоящее время не расшифрован, и которые не были протестированы на возможность перекрестной реакции. Присутствие в пробе таких микроорганизмов может привести к ложноположительному результату анализа.

3. Изменчивость микроорганизмов. Хотя при конструировании тест-системы фрагмент генома, используемый для амплификации, выбирается из высоко консервативной области, изменчивость микроорганизмов может приводить к тому, что некоторые генотипы или штаммы исследуемого возбудителя могут приобретать мутации в амплифицируемом участке генома, и, таким образом, становиться неуловимыми данной тест-системой.

Последние два пункта важны для разработчиков ПЦР-диагностикумов. В настоящее время разработаны стандарты, регламентирующие объем испытаний (включая проверку на перекрестные реакции, а также тестирование известных штаммов определяемого возбудителя), которые должна выдержать тест-система, прежде чем она попадет на рынок.

Вопросы для самоконтроля:

1. История открытия ПЦР-диагностики.
2. Какой фермент используется в ПЦР? Какова его особенность?
3. Расскажите основной принцип ПЦР.
4. Какие существуют ошибки при диагностике методом ПЦР?
5. Какие особенности хранения биологического материала?
6. Контаминация.
7. Перечислите и кратко охарактеризуйте преимущества метода ПЦР.
8. Какие существуют ограничения метода ПЦР?

9. МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА

В настоящее время многие люди страдают бесплодием. Возможности лечения бесплодия существенно расширились благодаря разработанной технологии криоконсервации половых клеток и эмбрионов. Хотя замораживание с последующим оттаиванием несколько снижает фертильную способность спермы и жизнеспособность эмбрионов, вероятность наступления беременности после их применения остается достаточно высокой, а на родившихся детей отрицательного влияния эти процессы не оказывают. Замороженные эмбрионы могут быть использованы в циклах, последующих за неудачной попыткой ЭКО, если яйцеклеток и эмбрионов было получено больше, чем это необходимо для переноса в текущем цикле. Это дает возможность не проводить женщине повторную стимуляцию яичников гормональными препаратами и осуществить перенос оттаявших эмбрионов в матку в любом из последующих за ЭКО циклов. Однако, необходимо отметить, что не все неиспользованные эмбрионы являются подходящими для замораживания. Криоконсервации подвергаются только эмбрионы с хорошей морфологией, у которых жизненный потенциал достаточно высок и которые по прогнозу эмбриолога смогут перенести процессы заморозки и оттаивания.

Криоконсервация (от греч. κρύος – холод и лат. conservo – сохраняю) – низкотемпературное хранение живых биологических объектов с возможностью восстановления их биологических функций после размораживания.

Криоконсервация – метод заморозки биологического материала, при помощи жидкого азота, который обеспечивает сохранение и жизнеспособность клеток после этапа разморозки. Температура при такой заморозке достигает -196°C . Процедура выглядит следующим образом: капсулы с биоматериалом помещаются в жидкий азот, где подвергаются быстрой заморозке. Именно такая низкая температура дает возможность приостановить в клетках все биохимические процессы, и позволяет хранить их долгое время.

В настоящий момент данная процедура очень широко применяется в клиниках, где лечат бесплодие при помощи вспомогательных репродуктивных технологий. КРИО дает огромные возможности семейным парам в данной области, затрагивая большое количество биоматериала, который подлежит криоконсервации.

Для благополучной заморозки следует соблюдать порядок многоэтапного криоконсервирования. Существует один негативный момент, который может затронуть подвергаемый материал при несоблюдении некоторых моментов. Клетки на 90 % состоят из воды, тем самым при криоконсервации существует риск кристаллизации воды, т. е. образование льда. Данный аспект, бесспорно, является губительным для биоматериала. Для того, чтобы избежать этих неприятных последствий замораживаемый материал подвергается специальной обработке при помощи криопротекторов. Криопротекторы – вещества, которые имеют способность изменить состав внутриклеточной жидкости, что, в свою очередь, предотвращает процесс кристаллизации.

Стоит учитывать также то, что не весь биоматериал переносит заморозку, и потеря замораживаемых клеток при разморозке в среднем составляет около 20 %.

9.1. Эффективность и объекты криоконсервации. Температурный режим

В настоящее время разработаны и успешно применяются в медицине, сельском хозяйстве и научном эксперименте методы криоконсервации клеточных культур, тканей (кровь, сперма), ранних (преимплантационных) эмбрионов. Изолированные органы плохо переносят криоконсервацию, методы криоконсервации целых органов не разработаны, эффективность их низкая. Случаи успешной трансплантации криоконсервированных органов редки, как правило, в таких случаях речь может идти не о восстановлении после размораживания целого органа, а о присутствии в размороженном органе отдельных областей живой ткани.

Другими словами, выживает после криоконсервации не орган как единое целое, а участки ткани, которые могут после трансплантации успешно прижиться (например, при трансплантации размороженной яичниковой ткани). Случаи успешной криоконсервации теплокровных животных (в т. ч. человека) до сих пор не зафиксированы. В настоящее время не существует методов, обеспечивающих выживание криоконсервированных людей, иных млекопитающих животных, а также птиц.

Как правило, криоконсервацию осуществляют при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, помещая капсулы с биологическими объектами в жидкий азот. Реже пользуются более высокими температурами (от -180 до $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$), которые создают электрифицированные морозильные камеры, но данный температурный режим менее надежен и подходит не для всех объектов.

Использование температур выше $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ малоэффективно и используется редко (например, хранение на сухом льду при $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$). Сохранение живых объектов при температурах около нуля градусов традиционно не относят к криоконсервации. Использование низких температур обеспечивает остановку биохимических процессов в клетках, в т. ч. останавливается обмен веществ и энергией с внешней средой, благодаря этому живые объекты могут сохраняться сколь угодно долго.

9.2 . Криповреждения и криопротекторы

Использование низких температур опасно для живых объектов. Живые клетки погибнут при замораживании, если не осуществить специальные защитные мероприятия. Основными повреждающими факторами при замораживании являются образование внутриклеточного льда и обезвоживание клетки. Образование внутриклеточного льда характерно для большой скорости охлаждения (более 10 К/мин). Кристаллизация внутриклеточной воды приводит к увеличению внутреннего объема мембранных структур (ядро, аппарат Гольджи, митохондрии, эндоплазматическая сеть, лизосомы, цитоплазматическая мембрана и пр.) Эти структуры

разрушаются. Обезвоживание клетки характерно для небольшой скорости охлаждения (менее 10 К/мин). Потеря клеткой воды происходит вследствие вымораживания воды во внешней среде и повышения концентрации растворенных веществ во внешней среде.

При охлаждении клетка может потерять до 80–90 % воды, при этом разрушаются гидратированные комплексы с макромолекулами, что приводит к так называемой «криоденатурации» – потере биологическими полимерами (прежде всего белками и белковыми комплексами) третичной и четвертичной структуры, что приводит к необратимой утрате функций этих полимеров. В криобиологии повреждения, получаемые клеткой при замораживании, называют «криоповреждения». Лишь некоторые клеточные культуры, а также бактерии могут быть эффективно криоконсервированы без предварительной подготовки. Для эффективной криоконсервации клетки замораживаемых объектов должны быть насыщены криопротекторами. После размораживания необходимо удалить криопротекторы из клеток.

9.3. Криоконсервация эмбрионов

Криоконсервация эмбрионов широко и с успехом применяется в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) практически во всех клиниках репродуктивной медицины. Это позволило врачам сократить количество свежих протоколов для пар проходящих лечение от бесплодия при помощи ВРТ. В стимулированном протоколе ЭКО у женщины зачастую созревает более 10 яйцеклеток, при благополучном оплодотворении получается несколько эмбрионов. Как правило, производят подсадку 1–2 эмбрионов в полость матки. При помощи криоконсервации у женщины появился шанс на последующие подсадки уже без стимуляций и негативного воздействия гормонов на организм. Перенос эмбрионов после криоконсервации происходит по желанию женщины иметь второго, третьего ребенка, либо после неудачного свежего протокола ЭКО. Так же такая практика осуществляется,

если женщина перенесла синдром гиперстимуляции яичников (СГЯ) в свежем протоколе и перенос эмбрионов пришлось отложить. В отличие от заморозки ооцитов, эмбрионы достаточно хорошо переносят криоконсервацию. Перед помещением в жидкий азот эмбрионы размещают в специальных емкостях: соломинках, криофлаконах, риопетлях. Как правило, при криоконсервации в одну емкость размещают 2–3 эмбриона. Во избежание кристаллизации клеток, перед заморозкой эмбрионы так же подлежат обработке специальными веществами – криопротекторами.

Как правило, криоконсервируют эмбрионы на стадиях: 4-х, 8-клеточного деления и бластоцист. Заморозке подвергают лишь эмбрионы хорошего качества, после оплодотворения в свежем протоколе ЭКО.

Преимущества криоконсервации эмбрионов:

1. Криоконсервация эмбрионов позволяет максимизировать потенциальное зачатие при ЭКО (экстракорпоральное оплодотворение) и предотвратить потери жизнеспособных нормальных запасных эмбрионов. Пожалуй, это самое важное преимущество криоконсервации. Около 50 % женщин могут иметь запасные эмбрионы для замораживания. В некоторых клиниках наступление беременности и рождаемость здоровых детей с помощью замороженных эмбрионов столь же высока, как и в случаях с переносом свежих эмбрионов.

2. Замораживание эмбрионов для последующей передачи можно посоветовать женщинам, которые находятся в группе риска по развитию тяжелого синдрома гиперстимуляции яичников после проведенной стимуляции яичников для экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

3. При имплантации эмбриона процесс может быть нарушен в таких случаях, как наличие полипов эндометрии, недостаточно развитый эндометрий, кровотечения или болезни приблизительно в одно время с переносом эмбрионов.

4. Трудности, возникающие при переносе свежих эмбрионов, возникают при переносе эмбрионов при стенозе шейки матки (неспособность пройти через канал шейки матки, т. к. шейка матки сужена или имеются рубцы и т. п.).

5. Криоконсервация эмбрионов является очень важной для включения в программы донорства яйцеклеток. Не всегда возможно синхронизировать цикл реципиента с циклом донора яйцеклетки. В некоторых странах является обязательным замораживание всех эмбрионов, созданных из донорских яйцеклеток, с последующим карантином сроком на шесть месяцев, пока доноры проходят повторные скрининг-тесты.

6. В результате успешной программы криоконсервации, замороженные эмбрионы также стали доступны для пожертвования бесплодным парам.

Перед химиотерапией или лучевой терапией.

9.4. Процедура замораживания и размораживания эмбрионов

Эмбрионы могут быть заморожены на любом этапе – одна клетка, в начале деления и бластоциста, если они хорошего качества. Эмбрионы хранятся в пакетах по одному или несколько экземпляров в зависимости от количества эмбрионов, которые могут быть пересажены в матку на более позднем сроке. Эмбрионы смешивают с криопротекторной жидкостью (для защиты эмбриона от повреждений во время замораживания). Затем смесь помещается либо в пластиковый контейнер, либо в стеклянную ампулу и хранится в жидком азоте при очень низкой температуре -196°C с использованием специализированных программируемых машин.

Обычное замораживание включает в себя медленное охлаждение эмбриона пока, наконец, он не замирает. Одной из основных проблем, связанных с обычными замораживаниями, является формирование кристаллов льда, которые могут повредить зародыш. Новый метод витрификации постепенно вытесняет традиционный метод. Он включает в себя сверхбыстрое замораживание, так что кристаллизация льда не происходит.

Оттаивание эмбрионов включает в себя удаление эмбрионов из жидкого азота, размораживание их при комнатной температуре, удаление криопротекторной жидкости и

помещение эмбрионов в специальную питательную среду. Смесь выдерживают в инкубаторе и готовят к пересадке.

Если эмбрионы были заморожены на стадии раннего деления или бластоцистов, они могут быть разморожены и пересажены в тот же день. Однако если они были заморожены на двухклеточном этапе деления, то они размораживаются на день раньше и культивируются в течение ночи, чтобы их можно было разделить и пересадить, когда они образуют 2–4 эмбриона. В разных странах созданы разные правила, касающиеся времени, в течение которого эмбрионы могут оставаться замороженными. В Соединенном Королевстве эмбрионы могут храниться в течение максимум 10 лет. Не все эмбрионы переживают процесс замораживания и оттаивания. При хорошей программе замораживания следует ожидать 75–80 % выживания. Таким образом, может быть необходимо оттаивать несколько эмбрионов одновременно, чтобы получить два или три полноценных эмбриона для пересадки. Повреждение эмбрионов имеет место в результате замораживания и во время процесса охлаждения и размораживания, а не во время хранения.

9.5. Криоконсервация спермы

С большим успехом криоконсервация используется для заморозки и хранения спермы. Перед сдачей спермы для криоконсервации мужчине необходимо соблюдать режим воздержания в течение 5–7 дней. После обработки собранного материала, сперму помещают в специальные контейнеры – пластмассовые трубочки небольшого диаметра. Затем трубочки подвергают заморозке при помощи жидкого азота. После криоконсервации сохраняется жизнеспособность и подвижность сперматозоидов, что позволяет с успехом использовать их для дальнейшего оплодотворения.

Криоконсервация спермы осуществляется по разным причинам. Самая распространенная – сбор донорского материала, для дальнейшей внутриматочной инсеминации или протокола ЭКО, женщинам по программе донорской спермы. Практически

в каждой клинике имеется своя база донорской криоконсервированного материала. Перед началом заморозки сперму тщательно исследуют на предмет подвижности, концентрации и нормальных форм сперматозоидов, и подвергают криоконсервации в том случае, если эти показатели укладываются в нормы. Так же может осуществляться заморозка спермы мужа. Данная процедура показана при предстоящей операции или мероприятии, после которых может пострадать выработка и подвижность сперматозоидов в эякуляте мужчины. Особое внимание в данном случае уделяется предстоящей химиотерапии при онкологических заболеваниях. В связи с губительным воздействием такого рода лечения, в данной ситуации единственным методом сохранения детородной функции мужчины является криоконсервация спермы до начала лечения рака. Срок хранения криоконсервированной спермы ограничен, и считается наиболее оптимальным криоконсервация в течение трех лет.

Процедура криоконсервации спермы

После получения спермы эмбриолог проводит спермограмму. При хороших показателях эякулят сразу же замораживается. При наличии единичных сперматозоидов или замораживании половых клеток, полученных в результате ТЕЗЕ, биоматериал предварительно концентрируется.

В генетический материал добавляют криопротекторы, спустя 10 мин этим содержимым заполняются специальные полипропиленовые пробирки, в которых будет осуществляться хранение спермы. После этого контейнеры помещаются в емкости с жидким азотом в криохранилище. Каждый из контейнеров тщательно маркирован: на нем указаны ФИО, номер карты и дата заморозки. На протяжении всего периода пребывания генетического материала в клинике ЭКО эмбриологи пристально следят за поддержанием оптимальных условий хранения, регулярно внося отметки в специальные журналы.

9.6. Криоконсервация ооцитов

Криоконсервация ооцитов отличается довольно сложным процессом. Чтобы добиться благополучной заморозки для ученых потребовались долгие годы работы над этой проблемой. Такой момент объясняется тем, что строение ооцита достаточно специфично. За счет свойств плазматических мембран и меньшего соотношения площади поверхности к объему процесс заморозки без осложнений очень затруднителен. Это усугубляет и тот факт, что зрелая яйцеклетка становится очень чувствительно к низким температурам, что может сказаться на дальнейшем делении уже размороженных клеток. Процесс оплодотворения размороженной яйцеклетки так же становится затруднительным за счет того, что данный метод приводит к уплотнению оболочки ооцита. Именно по этим причинам в процессе долгого исследования заморозки ооцитов учеными была разработана новая методика – витрификация. Благодаря данному методу происходит сверхбыстрая заморозка, за счет чего уменьшается риск кристаллизации воды в лед, что сводит к минимуму повреждение ооцитов.

Благодаря современным методам криоконсервации ооцитов, данная процедура с успехом осуществляется во многих клиниках репродукции всего мира. Показаниями для заморозки женских половых клеток может стать программа донорских ооцитов в протоколах ЭКО. Так же данная практика приходится на женщин, планирующих лечение с помощью химиотерапии, для возможности иметь ребенка после лечения онкологического заболевания. Криоконсервация ооцитов применяется и в других случаях: при невозможности оплодотворения яйцеклеток сперматозоидами на момент пункции, при желании молодых женщин сохранить яйцеклетки на неопределенное будущее, при запрете некоторых стран заморозки эмбрионов по религиозным соображениям.

На современном этапе развития ЭКО, выполнение программы стимуляции суперовуляции в большинстве случаев сопровождается получением большого числа яйцеклеток и эмбрионов. Разумеется, в полость матки переносятся не все эм-

брионы (не более 2-х). Оставшиеся «неперенесенными» эмбрионы, по согласованию с будущими родителями не уничтожаются, ведь неизвестно, наступит ли беременность в этой попытке ЭКО. Кроме того, нельзя забывать, что беременности после ЭКО отличаются повышенным риском невынашивания.

Помимо этого, невозможно сказать заранее, не захочет ли через некоторое время после родов эта семейная пара еще одного ребенка. Наряду с этим, иногда возможен отказ от переноса эмбрионов в цикле ЭКО, например, из-за явной угрозы развития синдрома гиперстимуляции яичников средней или тяжелой степени или из-за очень низкого качества эндометрии. Процесс криоконсервации эмбрионов намного уменьшает расходы на попытки, которые могут последовать в дальнейшем, кроме того, он помогает избежать дополнительную лекарственную нагрузку на женский организм во время индукции суперовуляции.

Учитывая все вышесказанное, эмбрионы хорошего качества подвергают криоконсервации, т. е. глубокой заморозке в жидком азоте, имеющем температуру около -196°C . Для этого эмбрионы помещают в специальную среду для заморозки, которая не позволяет образовываться кристалликам льда внутри клеток, которые могли бы разорвать клетку, а переводят цитоплазму клеток в благоприятное для замораживания и хранения в холоде гелеподобное состояние.

Плавность снижения температуры обеспечивается специальной высокоточной аппаратурой с компьютерной программой, а сама «заморозка» занимает 1,5–2 часа. Хранятся эмбрионы в специальном, произведенном промышленным образом, криобанке – дюаре в микроконтейнерах – трубочках, напоминающих тоненькие соломинки для коктейлей. В каждую такую «соломинку» набирают до 4–5 эмбрионов, и они лежат там в ряд, как горошины в стручке. Каждый микроконтейнер имеет четкие индивидуальные маркеры. Если у пациента несколько таких «соломинок», то все его контейнеры имеют идентичные маркеры, которые не позволяют перепутать его эмбрионы с чужими.

В таком состоянии эмбрионы могут храниться долгое время – недели, месяцы, даже годы. Сейчас в медицинской специализированной литературе появляются сообщения о наступлении беременности при переносе эмбрионов, которые пролежали в холоде более 10 лет. Конечно, процесс заморозки-разморозки является стрессом для эмбрионов, часть их при этом может быть потеряна. Вероятность наступления беременности после переноса эмбрионов, перенесших криоконсервацию, ниже, чем при переносе свежих эмбрионов, и составляет порядка 20–25 %. Это не так мало, если вспомнить, что вероятность беременности у здоровой семейной пары в одном менструальном цикле составляет примерно те же самые 20–25 %. Очень важно отметить, что течение беременности, наступившей после переноса эмбрионов, которые были законсервированы, ничем не отличается от обычной «экошной» беременности.

Такая беременность отличается от спонтанной, только гормональной поддержкой на ранних сроках. Поздние сроки беременности и родоразрешение никак не отличаются от обычной беременности и определяются акушерской ситуацией, а не способом зачатия. Подтверждается это огромным числом детей, старшим из которых уже около 10 лет, родившихся после «криобеременностей».

Такая же ситуация и со здоровьем детей, рожденных после этой процедуры. Они ничем не отличаются от сверстников, рожденных после обычной половой жизни родителей – ни по физическому, ни по ментальному развитию, ни по частоте пороков развития. Единственное, такие дети чаще попадают на прием к врачам, но не потому, что чаще болеют, а потому, что родители, которым дети достались очень нелегко, при первом же «чихе» ребенка немедленно обращаются к врачам и это, наверное правильно.

Преимущества криоконсервации ооцитов

Криоконсервация яйцеклеток имеет ряд преимуществ как этического, так физиологического характера:

1. Женщина может заморозить свои молодые яйцеклетки, а родить ребенка уже в более зрелом возрасте. Можно сказать, что

яйцеклетки с годами теряют свое качество. И в 20 лет у женщины гораздо больше шансов родить здорового малыша, нежели чем в 35–40.

2. Есть смысл криоконсервировать ооциты по медицинским показаниям. Например, онкобольным перед проведением химиотерапии, женщинам, страдающим от эндометриоза (заболевание вызывающее дисфункцию яичников).

3. Рационально использовать такую заморозку в цикле ЭКО. После стимуляции овуляции у женщины может созреть до 15 яйцеклеток, в то время как внедрить в матку можно только два эмбриона. Остальные же можно оставить на случай невынашивания беременности или же если возникнет желание родить еще одного ребенка. Криоконсервация яйцеклетки обойдется дешевле и безопасней для женщины, чем заново проводить процедуру стимуляции, пункции и т. д.

4. По этическим причинам заморозка яйцеклеток лучше криоконсервация готовых эмбрионов. В силу того, что по истечению времени в жизни людей многое меняется. Супруги могут расстаться или же еще возникает масса причин, по которым эмбрионы остаются невостребованными своими генетическими родителями. Это влечет за собой много проблем для медицинского центра, где хранятся замороженные эмбрионы, т. к. современное законодательство пока не предусматривает такие ситуации.

Криоконсервация яйцеклеток достаточно прогрессивная методика в репродуктивной отрасли. Витрификация клеток дает возможность онкобольным женщинам ощутить радость материнства. Это отличный шанс для бездетных пар стать родителями даже не одного малыша. Также одиноким женщинам дарит надежду в будущем стать матерью здорового ребеночка экстракорпоральная клетка.

Согласно статистике, дети, рожденные с помощью криотехнологии, ничем не отличаются от зачатых обычным, естественным путем. Заморозка не увеличивает риск развития врожденных патологий. Наоборот, можно отметить тенденцию естественного отбора, т. к. после процесса охлаждения-оттаивания выживают только качественные ооциты.

9.7. Экстракорпоральное оплодотворение как метод биоинженерии

Экстракорпоральное оплодотворение (от лат. extra – снаружи, вне и лат. corpus – тело, т. е. оплодотворение вне тела, сокр. ЭКО) – вспомогательная репродуктивная технология, используемая в случае бесплодия. Синонимы: «оплодотворение в пробирке», «оплодотворение in vitro», «искусственное оплодотворение».

Во время ЭКО яйцеклетку извлекают из организма женщины и оплодотворяют искусственно в условиях «in vitro» («в пробирке»), полученный эмбрион содержат в условиях инкубатора, где он развивается в течение 2–5 дней, после чего эмбрион переносят в полость матки для дальнейшего развития. Показанием к проведению процедуры ЭКО являются различные формы мужского и женского бесплодия. При отсутствии противопоказаний ЭКО может проводиться по желанию супружеской пары (женщины, не состоящей в браке) при любой форме бесплодия».

Противопоказаниями для проведения ЭКО является состояние женщины, при котором беременность и роды угрожают здоровью матери или ребёнка, а именно:

- соматические и психические заболевания, являющиеся противопоказаниями для вынашивания беременности и родов;
- врожденные пороки развития или приобретенные деформации полости матки, при которых невозможна имплантация эмбрионов или вынашивание беременности;
- опухоли яичников;
- доброкачественные опухоли матки, требующие оперативного лечения;
- острые воспалительные заболевания любой локализации;
- злокачественные новообразования любой локализации, в т. ч. в анамнезе.

Противопоказания для проведения ЭКО со стороны мужчины отсутствуют. Технологию ЭКО осуществляют в специализированных медицинских учреждениях в условиях амбулаторного лечения. Для проведения процедуры экстракор-порального оплодотворения необходимо получить яйцеклетки, получить сперматозоиды, провести оплодотворение in vitro, вырастить эмбрион, ввести эм-

брион в полость матки женщины. Как правило, для экстракорпорального оплодотворения стараются получить несколько яйцеклеток, т. к. это повышает эффективность лечения бесплодия этим методом. Поскольку в норме у женщины в течение одного менструального цикла созревает одна яйцеклетка, то для получения нескольких яйцеклеток проводят так называемую процедуру «стимуляции суперовуляции». Для этого пациентке назначают инъекции гормональных препаратов.

Для стимуляции используют инъекции препаратов фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), хорионического гонадотропина (ХГ), в сочетании с агонистами или антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ). Режим введения определенных препаратов-индукторов суперовуляции называют «схемой стимуляции» или "протоколом". Существует несколько схем стимуляции суперовуляции, но окончательное количество, виды и длительность введения препаратов подбирают индивидуально для каждой женщины, в зависимости от ее возраста, причины бесплодия и фолликулярного (яичникового) резерва. Стимуляция суперовуляции может занимать от 7 до 20 дней и представляет собой инъекции или прием таблетированных препаратов.

Созревание яйцеклеток непосредственно не может быть определено неинвазивными методами. Поэтому о созревании яйцеклеток судят косвенно по росту фолликулов яичника. Рост фолликулов наблюдают с помощью аппаратов ультразвукового исследования. При достижении доминантным фолликулом определенного размера (16–20 мм) назначают процедуру извлечения яйцеклеток – пункцию фолликулов яичника. Пункцию фолликулов проводят под общей (чаще) или местной (реже) анестезией, иглу проводят трансвагинально, ход иглы контролируют аппаратом УЗИ. Целью пункции является аспирация (отсасывание) содержимого фолликула (фолликулярной жидкости). Полученную жидкость исследуют с помощью микроскопа для обнаружения ооцитов (яйцеклеток).

Полученные ооциты отмывают от фолликулярной жидкости и переносят в чашки Петри, содержащие культуральную среду,

которые помещают в инкубаторы до момента добавления подготовленных сперматозоидов.

Обычно использование гормональных препаратов и проведение пункции фолликулов не вызывает негативных реакций у пациентки, но иногда могут возникнуть осложнения. Осложнением стимуляции суперовуляции является синдром гиперстимуляции яичников (СГЯ), который может развиваться вот время и спустя несколько дней после окончания стимуляции в результате созревания большого количества фолликулов. Пункция фолликулов может осложниться наружным или внутренним кровотечением.

При невозможности получить яйцеклетки у пациентки (отсутствие яичников, менопауза и пр.) возможно использование донорских яйцеклеток (т. е. яйцеклеток другой женщины). В качестве донора яйцеклеток может выступать бескорыстный донор (родственница, знакомая) или платный донор.

Вопросы для самоконтроля:

1. Дайте определение криоконсервации.
2. Какова эффективность криоконсервации и какие объекты используются?
3. В чем особенность температурного режима и какова его роль в криоповреждении?
4. Как происходит замораживание и размораживание эмбрионов?
5. Как проводится процедура криоконсервации спермы?
6. Каковы преимущества криоконсервации ооцитов?
7. Дайте характеристику экстракорпоральному оплодотворению.

10. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Важнейшим результатом изучения генома человека явилось быстрое развитие нового направления – молекулярной медицины. Сегодня, благодаря ее возникновению можно получить информацию об особенностях структуры индивидуального генома (генетический паспорт), в т. ч. о генах предрасположенности к определенным генетически обусловленным заболеваниям.

Генетизация медицины привела к появлению нового направления в биомедицине – генной терапии, которое базируется на достижениях молекулярной биологии, генной и клеточной инженерии, а также новых информационных технологий.

Изначально под генной терапией понималось лечение наследственных заболеваний путем коррекции мутантных генов на уровне хромосомной ДНК. Однако сложность проблемы заставила ученых пересмотреть взгляды на методологию. К настоящему времени исследователи лишь «нащупали» подходы к такому решению проблемы (технология химеропластики). Ввиду сложности задачи корректировки генома, наибольшее распространение получили методы, основанные на введении в организм больного полноценных функционально активных (терапевтических) генов в составе плазмидной ДНК.

Концепция генной терапии появилась сразу после осознания механизмов трансформации клеток опухолеродными вирусами. Вирусы осуществляют стабильное внедрение своего генетического материала в геном клетки хозяина, и поэтому было предложено использовать их, как векторы для доставки желаемой генетической информации в клетки, чтобы в случае необходимости поправлять клеточные дефекты и лечить болезни генома.

Первые клинические испытания методов генной терапии были предприняты 22 мая 1989 г. с целью генетического маркирования опухолинфильтрующих лимфоцитов в случае прогрессирующей меланомы.

Первым моногенным наследственным заболеванием, в отношении которого были применены методы генной терапии,

оказался наследственный тяжелый иммунодефицит (ADR), обусловленный мутацией в гене аденозиндезаминазы. 14 сентября 1990 г. под руководством Френча Андерсона в Бетесде (США) четырехлетней девочке, страдающей этим редким заболеванием, были пересажены ее собственные лимфоциты, предварительно трансформированные вне организма геном аденозиндезаминазы.

Лечебный эффект наблюдался в течение нескольких месяцев, после чего процедура была повторена с интервалом 3–5 месяцев. За три года терапии в общей сложности были проведены 23 внутривенные трансфузии трансформированных Т-лимфоцитов без видимых неблагоприятных эффектов. В результате лечения состояние пациентки настолько улучшилось, что она смогла вести нормальный образ жизни и не бояться случайных инфекций. 14 сентября 1990 г. считается днем рождения реальной генной терапии.

Исторически генная терапия нацеливалась на лечение наследственных генетических заболеваний, но впоследствии поле ее применения расширилось. В настоящее время генная терапия стала рассматриваться как потенциально универсальный подход к лечению практически всего спектра заболеваний, начиная от инфекционных, включая так называемые болезни современного общества (рак, атеросклероз, диабет), и заканчивая классическими генетическими, наследственными заболеваниями.

В современном понимании генная терапия – это совокупность биомедицинских технологий лечения дефектов генов с помощью введения в организм генетических конструкций, способных восстановить или заменить дефектный ген, экспрессировать полноценный генный продукт или блокировать работу мутантных и чужеродных генов.

10.1. Виды генной терапии

В генотерапии используют два основных подхода, различающихся природой клеток-мишеней, и соответственно выделяют два вида генной терапии.

Фетальная генотерапия. При этом виде терапии генетическую конструкцию вводят в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития (введение генов *in utero*). Ожидается, что введенный материал попадет во все клетки реципиента (и даже в половые клетки, обеспечив тем самым передачу следующему поколению).

При эмбриональной генной терапии доставка терапевтического гена может быть осуществлена путем его введения в амниотическую полость. Это привлекательно с точки зрения контроля за самой процедурой с помощью различных способов, начиная от ультразвука и заканчивая амниоцентезом (пункция плодного пузыря) и анализом образцов хориональных ворсинок. Подобные манипуляции широко используются в клинике и почти полностью безопасны для зародыша и матери.

Доставку генетических конструкций в клетки плода можно осуществлять через эмбриональное кровообращение путем введения в пупочную вену. В настоящее время уже введена в клинику процедура забора крови эмбриона с помощью иглы под контролем ультразвука. Такие манипуляции могут быть осуществлены с шестой недели беременности, если необходимо получить гематопозитические клетки или доставить генотерапевтический вектор к недоступным органам.

Большинство методов фетальной генотерапии разработаны на трансгенных мышах. Чужеродную ДНК вводили в оплодотворенные яйцеклетки, полученные от мышей с искусственно стимулированной овуляцией. Затем яйцеклетки имплантировали в матку приемной матери. С помощью этого метода удалось заметно улучшить состояние мышей с наследственным дефицитом соматотропного гормона миеллина. В подобных экспериментах была получена важная информация о регуляции экспрессии генов и патогенезе наследственных болезней. Однако пока трансгенные животные получают только из 15–20 % яйцеклеток с инъектированной ДНК, причем лишь у 20–30 % животных введенный ген экспрессируется. Более того, из-за случайного встраивания чужеродной ДНК в клеточный геном есть опасность повреждения генов хозяина (инсерционный мутагенез), приводящий к дефициту белка или

нарушению регуляции, что может стать причиной злокачественного новообразования.

Таким образом, фетальная генотерапия пока недостаточно разработана для лечения наследственных болезней человека. В то же время методы, разработанные в экспериментах с эмбриональными клетками, могут быть использованы для пренатальной диагностики наследственных заболеваний на ранней стадии внутриутробного развития.

Соматическая генотерапия. При данном подходе генетический материал вводят только в соматические клетки, и он не передается половым клеткам. При соматической генной терапии генетические конструкции могут быть введены системно – *in vivo* (внутривенно, внутримышечно) и локально – *in situ* (сосуды, органы, опухоли), что наиболее предпочтительно и составляет основу терапевтических протоколов.

Если фетальная генотерапия пока неприемлема для лечения наследственных заболеваний человека, то соматическая генная терапия уже используется в клинической практике.

10.2. Способы введения (доставки) терапевтических конструкций в организм

Существует три различных технологии (способа) введения терапевтической генетической конструкции больному при соматической генной терапии – *in vivo*, *in situ* и *ex vivo*.

Технология *in vivo* (системное введение через кровь) пока не реализована на практике. Это связано с затруднениями в разработке терапевтических протоколов, вызванными множеством потенциальных тканей-мишеней (кожа, мышцы, легкие, мозг, печень, клетки крови и т. д.). Многочисленность различных мишеней требует создания специфических и эффективных систем адресной доставки генетической конструкции.

In situ генная терапия. Эта технология предполагает доставку генетических конструкций (чаще всего в составе вирусных векторов) локально, непосредственно в ткани организма. Для данного способа введения необходимы два условия: первое заключается в том, чтобы клетки-мишени были

легкодоступны, и второе условие, – чтобы генетическая конструкция специфично проникала непосредственно в клетки-мишени и экспрессировала терапевтический ген длительное время и на высоком уровне.

Примерами генной терапии *in situ* служат:

- генная терапия муковисцидоза, основанная на локальном введении терапевтического гена в составе аденовирусного вектора в эпителий дыхательных путей;
- введение генноинженерных конструкций в массу опухоли в случае терапии злокачественных новообразований.

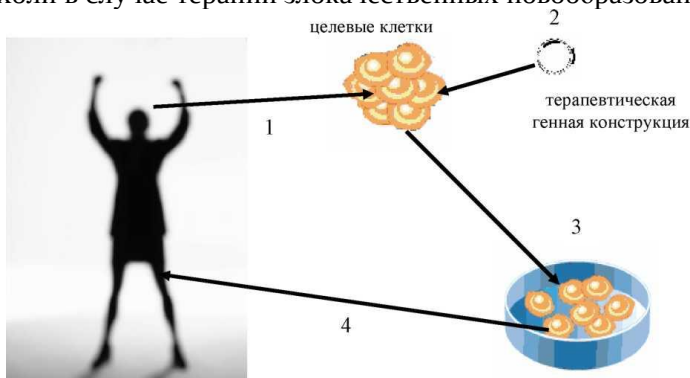


Рис. 18. Этапы генной терапии *ex vivo*:

- получение клеток от больного;
- исправление генетического дефекта с помощью терапевтической генной конструкции;
- отбор и наращивание «исправленных» клеток;
- инфузия или трансплантация этих клеток пациенту

Ex vivo генная терапия. Представляет собой технологию, основанную на трансплантации (инфузии) собственных (аутологичных) клеток больного. При этом подходе из организма изолируют клетки, вводят в них требуемую генетическую информацию и затем возвращают в тот же организм. Эти клетки иммунная система не отторгает.

Преимуществом генной терапии *ex vivo* является то, что можно полностью охарактеризовать полученные трансформированные клетки до их трансплантации в организм, можно получить многочисленные клоны этих клеток и отобрать клоны

с высоким уровнем экспрессии требуемого гена, а также исключить клоны с опасными трансформациями, которые могли бы нанести вред организму.

Использование технологии *ex vivo* просто решает проблему направленной доставки функционального гена в том случае, если из организма извлекают клетки определенного типа (лимфоциты, стволовые гемопоэтические клетки, фибробласты, кератиноциты или гепатоциты), которые после трансфекции *in vitro* возвращаются в организм.

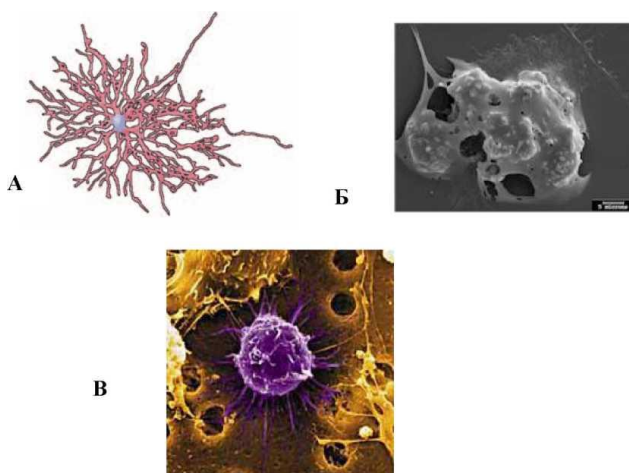


Рис. 19. Бластоциты, используемые в генной терапии:
А – первичный астроцит ЦНС; Б – фибробласт; В – стволовая клетка красного костного мозга

Для реализации стратегии *ex vivo* в качестве средств доставки генетической информации могут быть использованы аутогенные первичные клетки (бластоциты). Первые эксперименты были проведены с первичными астроцитами, которые были отобраны у взрослых доноров, трансфецированы и затем помещены в ткани центральной нервной системы, где эти клетки поддерживали длительную экспрессию введенного гена.

Прекрасными суррогатными клетками являются фибробласты, которые обладают способностью долго

пролиферировать в культуре, не трансформируясь, легкодоступны для отбора у доноров, полноценно поддерживают экспрессию встроенных генов. В последние годы проведены многочисленные эксперименты, направленные на применение фибробластов в генной терапии различных заболеваний.

Однако при использовании различных бластоцистов могут возникать сложности при их помещении после трансфекции в «неродные» ткани. Например, при трансплантации фибробластов в ткани центральной нервной системы они экспрессируют коллагены и другие свойственные коже вещества, которые нарушают правильное функционирование системы. Все эти проблемы могут быть преодолены при использовании стволовых клеток. Основным преимуществом стволовых клеток является высокая совместимость с любыми тканями организма, что предполагает их длительное выживание и поддержание долговременной экспрессии введенных генетических конструкций.

Наиболее часто используются гематopoэтические стволовые клетки периферической крови. Они обладают широкой пластичностью, легкодоступны для сбора и последующего возвращения в кровь. Первичная предопределенность их к тем или иным органам (мозг, миокард) предполагает самостоятельный хоминг к необходимому органу.

Стволовые клетки костномозгового происхождения менее применимы для генотерапевтических манипуляций в связи с их труднодоступностью, сложностью культивирования и низкой эффективностью трансфекции с помощью вирусных векторов.

В процессе изучения находится методология использования фетальных стволовых клеток. Фетальные стволовые клетки достаточно хорошо культивируются, могут быть трансфецированы с применением классических методов. Проведены эксперименты по применению этих клеток для лечения болезни Паркинсона, нейродегенеративных заболеваний, диабета.

10.3. Позитивная генная терапия

Позитивная генная терапия направлена на восстановление функции гена, экспрессия которого может быть недостаточной или отсутствовать полностью. В большинстве случаев различные методы позитивной генной терапии направлены на коррекцию поврежденного гена.

Коррекция гена на уровне хромосомной ДНК

Восстановление функции гена путем его замены или дублирования. Такой подход может быть использован, например, при лечении рецессивных наследственных заболеваний, когда клетки теряют функцию какого-либо гена, и для лечения нужно эту функцию восстановить.

Идеальная стратегия предполагает «вырезание» больного гена или его части и замена его здоровым. Это можно было бы сделать с помощью таргетинга. Таргетинг (от англ. «target» – мишень) – встраивание генотерапевтической конструкции в определенное место генома, что позволяет обеспечить гену истинно природный путь регуляции. Для достижения эффективной гомологичной рекомбинации в состав вводимых конструкций включают селективные маркеры, которые обеспечивают встраивание в геном клетки трансгенов, наиболее предрасположенных к рекомбинации. Однако таргетинг различных генов с дополнительными последовательностями осложняется непредсказуемыми последствиями, которые могут быть причиной злокачественной трансформации клеток человека.

В настоящее время используют другой, близкий к таргетингу способ коррекции, который предполагает введение здоровых генов при условии сохранения в клетке больного гена. Дополнительный здоровый ген увеличивает количество недостающего клетке или организму продукта. Этот способ называют пополняющей (augmentative) генной терапией. Однако при такой терапии может происходить инсерционный мутагенез и правильная регуляция экспрессии трансгена нарушается. Трансген с нарушенной регуляцией называют эктопическим.

Репарационная коррекция генетических дефектов с использованием химерных олигонуклеотидов. Такая генотерапевтическая коррекция имеет несколько значительных преимуществ перед другими подходами генной терапии. Во-первых, при репарации того или иного дефекта ген остается под контролем нативных регуляторных элементов. Во-вторых, коррекция может быть направлена на восстановление как рецессивных, так и доминантных мутаций. В-третьих, репарация подразумевает использование небольших синтетических молекул, которые слабо иммуногенны. В-четвертых, применение небольших молекул облегчает их проникновение в клетку, а затем и в ядро. И, наконец, эффективно разработанная генная коррекция может быть успешно применена в течение одного курса лечения.

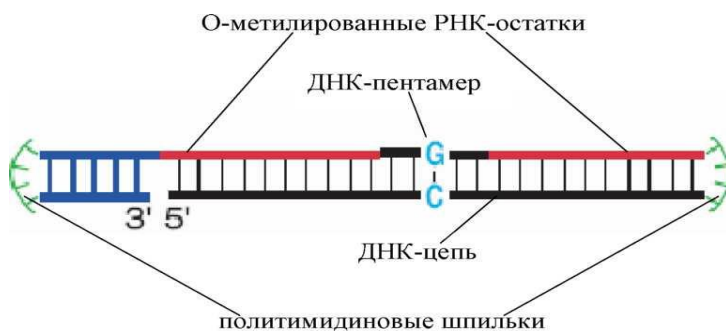


Рис. 20. Химеропласт

Химеропластика – использование химерных одно- или дву- нитевых РНК/ДНК олигонуклеотидов (химеропластов), способных образовывать гомологичные пары и осуществлять сайт-специфическую гомологичную рекомбинацию с ДНК-дуплексом. Первая химера представляла собой 68-членный ДНК-РНК двуцепочный олигонуклеотид. Одна цепь данного химеропласта состояла из центрального пентамерного блока ДНК-остатков, фланкированных по краям десятью 2'-О-метилированными РНК-остатками (О-метилирование

предотвращает расщепление РНК-последовательности РНКазой).

Вторая цепочка была представлена комплементарной цепью ДНК. Вторичную структуру химере обеспечило наличие по краям политимидиновых шпилек. Концы молекул объединены за счет GC-оснований, способствующих повышению экзонуклеазной устойчивости. 3'- и 5'-концы полученной химеры лишь приближены, но не замкнуты для последующего завершения работы этой химеры на месте и для возможного присоединения белков-рекомбиназ. Незамкнутость позволяет молекуле быть достаточно гибкой, что повышает ее способность взаимодействовать с гомологичной цепью. Обе цепочки – и верхняя, и нижняя – гомологичны геномной цели, за исключением пентамерной ДНК-области в химерной цепи.

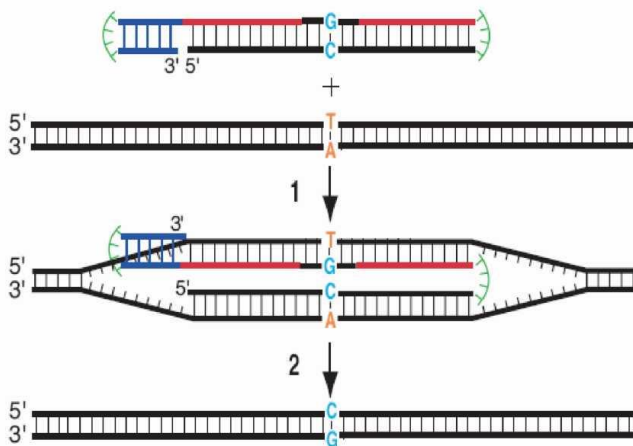


Рис. 21. Коррекция генетического дефекта с использованием химеропласта в процессе сайт-специфической гомологичной рекомбинации

Введение в клетку химеропластов осуществляют с помощью липосом. При попадании в клетку химера очень точно образует гомологичные пары с нуклеотидами гена-мишени, за исключением мисмэтча (от англ. mismatch – несоответствие) – области несоответствия двух нуклеотидных оснований, которые и нужно заменить. Образование этих мисмэтчей приводит к

запуску специализированной клеточной ДНК-репарирующей системы.

Испытание технологии химеропластики было проведено на различных объектах – лимфобластах, растительных клетках, дрожжах. Показательными опытами явились опыты с меланоцитами мышей-альбиносов – использование химеропластов привело к восстановлению гена тирозиназы – основного фермента синтеза меланина.

Применение химеропластов дало положительные результаты при коррекции гена, кодирующего мутантную изоформу аполипопротеина Е, приводящего к развитию гиперлипидемии и раннему атеросклерозу. Опыты на клеточной культуре привели к коррекции генов в 54 % клеток. В опытах на лабораторных животных эффект проявился в 25 % случаев.

Технология химеропластики также была применена при одной из форм *b*-талассемии, обусловленной точечной мутацией во втором интроне *b*-глобинового гена. Эта мутация приводит к тому, что интрон распознается как аутентичный сайт сплайсинга. В результате этого часть интрона включается в процессированную мРНК, сдвигается рамка считывания и образуется укороченный белок. Антисмысловый химеропласт, комплементарный мутантному интрону, гибридизуясь с ним, блокирует ошибочный сплайсинг. В результате введения такого антисмыслового олигонуклеотида в культуру человеческих малигнизированных стволовых клеток-предшественников эритроцитов число нормальных *b*-глобиновых цепей увеличилось на 50 %.

Основными проблемами, возникающими при проведении химеропластики, являются:

- выявление и молекулярно-генетическая характеристика определенного дефекта;
- конструирование специфичного химеропласта;
- создание условий для взаимодействия химеропласта с рекомбиназными белками;
- включение системы репарации.

Внехромосомная экспрессия введенного гена.

Методические сложности, связанные с коррекцией дефектов гена на уровне хромосомной ДНК и непредсказуемость вмешательства в генетическую информацию клеток, тормозят развитие данного направления позитивной генной терапии. В связи с этим значительное развитие получили методы введения в клетки организма нормальных функционально активных генов, которые могут быть встроены в специфические места хромосомы или экспрессироваться внехромосомно.

В настоящее время наибольшее применение получила методология использования в качестве лечебного препарата генетических конструкций, способных к автономной репликации и экспрессии встроенных генов. При этом в генетическую конструкцию могут быть введены, как функционально активные гены – аналоги дефектных генов (терапевтические гены), так и последовательности ДНК, регулирующие активность гена с недостаточной экспрессией. Таким образом, в отличие от методологии, направленной на коррекцию ДНК, данный подход не предполагает вмешательства в структуру хромосомной ДНК.

Разработке внехромосомной генной терапии способствовало получение знаний:

- первичной структуре генов, ответственных за наследственные онкологические и другие заболевания;
- функции и роли в метаболизме продуктов этих генов;
- положении гена в хромосоме и его окружении (наличие регуляторных элементов).

Для успешной реализации данного направления положительной генной терапии должны быть решены две глобальные задачи. Во-первых, должна быть создана терапевтическая генетическая конструкция. При создании такой конструкции используют технологию рекомбинантных ДНК, которая включает несколько этапов:

- выделение терапевтического гена в контексте регуляторных последовательностей. В настоящее время этот этап значительно упростился в связи с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР);

- выбор или создание векторной ДНК, удовлетворяющей поставленной цели;
- выделение или искусственный синтез регуляторных элементов;
- лигирование фрагментов ДНК (ДНК вектора, гена, регуляторных элементов, маркерных участков) в нужной последовательности и ориентации;
- клонирование конструкции в оптимальных клетках и отбор рекомбинантных клонов. Проверка эффективности экспрессии гена и свойств его продукта.

Вторая глобальная задача, которая должна быть решена для успешного результата внехромосомной генной терапии – осуществление адресной доставки генетической конструкции в целевые клетки-мишени, т. е. трансфекции (в широком смысле) или трансдукции (при использовании вирусных векторов).

Трансфекция может проводиться с использованием:

- чистой («голой» – от англ. naked) ДНК;
- встроенной в соответствующую плазмиду, или комплексированной ДНК (плазмидная ДНК, соединенная с солями, белками (трансферрин), органическими полимерами);
- ДНК в составе вирусных частиц, предварительно лишенных способности к репликации.

Основные методы доставки терапевтических генов в клетки разделяют на биологические (на основе векторных систем), химические и физические (безвекторный перенос).

10.4. Негативная генная терапия

Часто при инфекциях или опухолевой трансформации заболевание вызывается избыточной функцией гена, несвойственной нормальной клетке. В таких случаях генная терапия направлена на подавление сверхактивного гена, или функции «больного» гена путем введения в клетки генетических конструкций, экспрессирующих факторы, которые тем или иным способом взаимодействуют с продуктом экспрессии нежелательного гена и нейтрализуют его вредный эффект.

Подавление функции гена на уровне мРНК. Терапия антисенс РНК. Эффекта подавления негативного гена можно достичь, поместив в клетку конструкцию, которая будет подавлять работу гена на уровне мРНК. Это может быть осуществлено с помощью экспрессии в клетке структур, обеспечивающих синтез РНК, комплементарной мРНК дефектного гена – антисенс РНК.

Примером генной терапии с помощью антисенс РНК являются эписомные экспрессирующие векторы, в которые встроены комплементарные ДНК инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) или его рецептора, находящиеся в обратной ориентации под контролем металлотионеинового промотора. IGF-1 вырабатывается в избыточном количестве клетками злокачественной глиомы – наиболее распространенной опухоли головного мозга, а его рецептор – клетками карциномы предстательной железы.

Терапия антисмысловыми РНК. В 1978 г. было показано, что олигонуклеотид, состоящий из 13 остатков и комплементарный матричной РНК вируса саркомы Рауса, может ингибировать репликацию вируса. Такая синтетическая РНК была названа антисмысловой. Будучи введенным в клетку, олигонуклеотид, комплементарный определенной мРНК (например, вирусной мРНК, или мРНК онкогена), связывается с ней. В результате трансляция этой мРНК специфически ингибируется.

Идеологически эти два подхода сходны, но есть и существенная разница. Антисенс РНК постоянно экспрессируется клеткой, в которую для этого вводится специальная генетическая конструкция. Антисмысловую РНК вносят в клетку извне, кроме того, необходимы многократные введения, чтобы сделать действие этой терапии эффективным.

Терапевтический эффект синтетических антисмысловых олигонуклеотидов зависит от специфичности их гибридизации с доступным сайтом мРНК-мишени, устойчивости к действию клеточных нуклеаз и наличия системы доставки в клетку. Нуклеотидные последовательности размером 15–20 оснований

гибридизуются с уникальными мРНК с достаточно высокой специфичностью.

Потенциальные сайты-мишени определяют тестированием набора «антисмысловых» олигонуклеотидов с использованием культуры клеток, синтезирующих мРНК-мишень. С этой целью проводят электрофоретическое разделение клеточных белков, в которые включают радиоактивную метку во время трансляции, и с помощью радиоавтографии устанавливают, в присутствии какого из антисмысловых олигонуклеотидов снижается синтез определенного белка. Общих критериев выбора наилучших сайтов-мишеней в разных РНК-транскриптах не существует. Эффективными могут оказаться олигонуклеотиды, комплементарные 5'- или 3'-концам мРНК, границам экзонов и интронов и даже двухцепочным областям.

Для защиты от действия нуклеаз в антисмысловых РНК модифицируют пиримидиновые основания и дезоксирибозу. Заменяют свободный атом кислорода фосфодиэфирной связи на сульфогруппу, в результате чего образуется тиофосфорная связь. Синтезированы антисмысловые олигонуклеотиды с фосфорамидной и полиамидной связями. Химические группы, присоединенные к 2'-углеродному атому сахарного остатка и С5-атому пиримидинов, также защищают антисмысловые РНК от действия нуклеаз и облегчают их связывание с сайтом-мишенью.

Доклинические испытания показали, что антисмысловые олигонуклеотиды могут быть эффективными лекарственными средствами при генной терапии стеноза коронарных и сонных артерий (пролиферация гладкомышечных клеток и секреция межклеточного вещества во внутренний слой артерий), приводящего к инфарктам и инсультам.

Генная терапия с использованием рибозимов. Еще одним способом подавления экспрессии гена на уровне мРНК является использование рибозимов – РНК, обладающих ферментативными свойствами. В генной терапии применение рибозимов оправдано тем, что введение в клетку конструкции, кодирующей определенный рибозим, направленный на расщепление той

или иной мРНК, не требует больших по объему и многократных введений, по сравнению с антисмысловыми РНК.

Создание «терапевтического» рибозима – сложный процесс. Связано это с трудностью получения больших количеств синтетических РНК и сохранения их в нативном состоянии в клетке-мишени. В одном из экспериментов синтезировали олигодезоксинуклеотид, который содержал каталитический домен (20 нуклеотидов), фланкированный гибридизующимися с мРНК-мишенью последовательностями (они же выступали в роли праймеров), амплифицировали его, встраивали в эукариотический экспрессирующий вектор и трансфецировали клетки полученной конструкцией. Образовавшийся после транскрипции рибозим, расщеплял мРНК-мишень и подавлял трансляцию белка, ответственного за развитие того или иного заболевания.

Природных ДНК-ферментов (дезоксирибозимов) пока не обнаружено, но уже синтезированы олигодезоксинуклеотиды, обладающие каталитической активностью. Преимущество дезоксирибозимов состоит в том, что для их получения не нужно использовать экспрессирующий вектор: ДНК-ферменты можно упаковывать в липосомы и доставлять в клетки-мишени.

Генная терапия днРНК. Другой способ негативной генотерапии на уровне мРНК основан на одном из механизмов клеточной защиты от вирусов и других возможных «покушений» на геном в форме трансгенов или транспозонов. В результате заражения вирусами в клетках образуется некоторое количество двунитевой РНК (днРНК). Источником днРНК могут быть:

- вирусы, геном которых представлен днРНК;
- вирусы, геном которых представлен однонитевой РНК (онРНК), в результате ее репликации образуется днРНК или при образовании вторичной структуры (шпильки);
- днДНК – в результате комплементарного слияния продуктов транскрипции двух разных цепей ДНК может образоваться днРНК.

днРНК активирует процессы, приводящие к блокаде экспрессии генов в результате гомологичной рекомбинации.

Этот механизм получил название интерференция РНК. днРНК большой длины подвергаются расщеплению на более мелкие фрагменты длиной около 22 нуклеотидов – короткие интерферирующие РНК (киРНК). Ключевым ферментом этой реакции является дайсер РНКазы III (от англ. *Dice* – нарезать на кусочки), имеющаяся у различных организмов.

После образования киРНК, к ним присоединяются дополнительные белки, необходимые для формирования специфического мРНК-деградирующего эндонуклеазного комплекса (RISC). Этот комплекс присоединяется к комплементарным фрагментам синтезируемой чужеродной мРНК и расщепляет ее. Кроме того, получены данные о блокаде трансляции чужеродной мРНК с помощью РНК-белкового комплекса. За открытие процесса РНК-интерференции Эндрю Фаер и Крэйг Мэлло (США) в 2006 г. получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

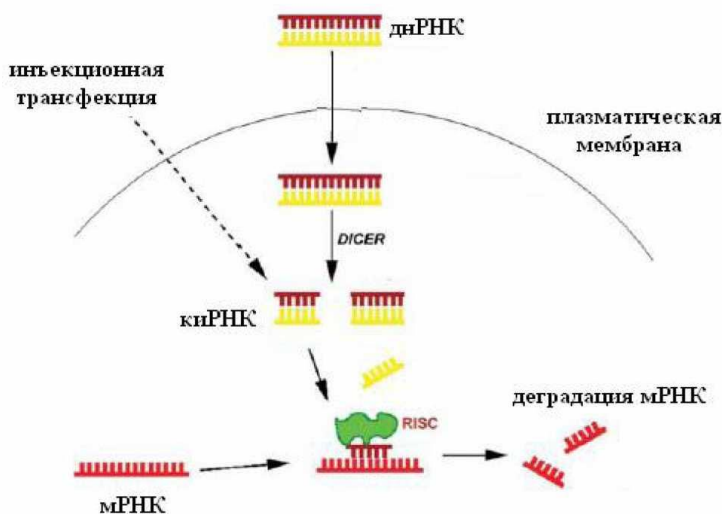


Рис. 22. Механизм РНК-интерференции

Открытие механизма РНК-интерференции привело к активизации многочисленных исследований по использованию днРНК в генной терапии. На первых этапах проводили

эксперименты по интродукции в клетки длинных днРНК, которые приводили к запуску РНК интерференции. Однако было показано, что длинные днРНК очень часто вызывают неспецифическую активацию генов, кодирующих интерфероны. Такой исход не приведет к специфической интерференции и блокаде определенных мРНК. Далее исследователи стали использовать уже химически или энзиматически синтезированные киРНК, тем самым, минуя этап их образования в клетке.

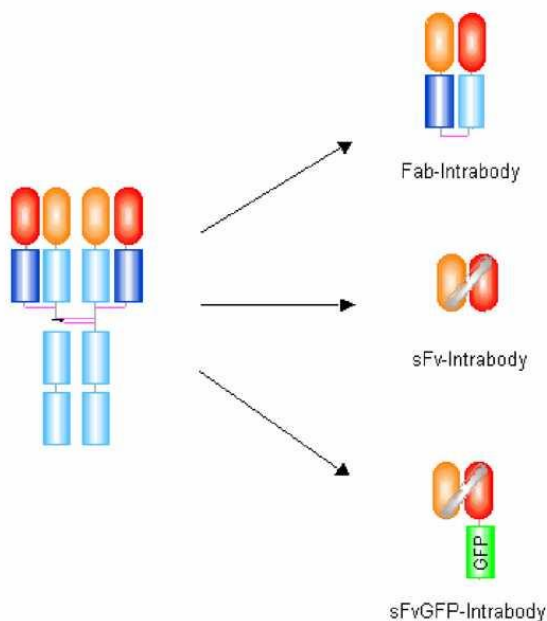


Рис. 23. Варианты одноцепочных антител

Подавление функции гена на уровне белка. Внутриклеточная иммунизация. Это один из способов подавления функции гена на уровне белка. Термин «внутриклеточная иммунизация» был предложен нобелевским лауреатом Дэвидом Балтимором. Внутриклеточная иммунизация может быть осуществлена двумя способами: введением в клетку генетической конструкции, экспрессирующей антитела для

нейтрализации нежелательного белка, и введением собственно антител.

Молекулы антител слишком велики для внутриклеточного использования, в связи с этим осуществляют модификацию антител, объединяя вариабельные участки легкой и тяжелой цепей соединительным пептидом. Это существенно облегчает конструкцию и не отражается на связывании модифицированных антител с антигенами. Подобные конструкции получили название одноцепочных антител (intrabodies). К таким антителам могут быть присоединены различные сигнальные последовательности, которые будут направлять их в определенные клеточные структуры и компартменты.

Генная терапия с помощью аптамеров. Аптамеры представляют собой синтезированные *in vitro* олигонуклеотиды, способные связываться с белками. Такие аптамеры, присоединяясь к определенному белку, в норме не связанному ни с какими нуклеиновыми кислотами, блокируют его функцию.

Так, антитромбиновый аптамер может стать недорогим средством профилактики тромбообразования при различных хирургических вмешательствах. Для его получения использовали набор химически синтезированных олигонуклеотидов, состоящих из 18-нуклеотидных фланкирующих областей (праймеров) и центрального 60-нуклеотидного участка, представляющего собой случайную последовательность нуклеотидов. Образец пропустили через колонку, содержащую связанные молекулы тромбина, присоединившиеся к тромбину олигонуклеотиды элюировали и повторно пропустили через эту колонку. Эту процедуру повторяли несколько раз. Конечный набор тромбиновых аптамеров амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали, после чего определили физические и биологические свойства каждого из них. Те аптамеры, которые обладали высоким сродством, специфичностью и антитромбиновой активностью, отбирали для более детального анализа.

Таким образом был получен эффективный антитромбиновый аптамер. К сожалению, вследствие малого времени жизни *in vivo* его можно использовать только для временного

ингибирования функции тромбина (например, при кардиопульмонарном шунтировании).

10.5. Генная терапия различных заболеваний

К 2005 г. более 4500 болезней определены как генетически обусловленные заболевания. В настоящее время не существует единой общепринятой классификации генетически детерминированных, наследственных болезней. Это в значительной степени связано с трудностями, возникающими при выборе критерия, который должен быть положен в основу выделения отдельных групп и форм генетически обусловленных, наследственных заболеваний. В качестве одного из таких критериев можно было бы использовать общность патогенетических механизмов болезней. Однако такое деление может привести к тому, что в одну группу попадут патологии, различные по клиническим проявлениям, что значительно затруднит использование такой классификации врачами-клиницистами.

В последние годы в связи со значительными успехами, достигнутыми при изучении природы генетически обусловленных заболеваний, возникли все предпосылки для создания генетической классификации, основанной на различии в этиологии. Однако и в случае использования этой классификации возникают трудности. Они связаны с наличием гетерогенности, в результате которой может не наблюдаться прямой корреляции между генотипом и фенотипом. Нередко бывает, что идентичное по клиническим проявлениям заболевание может быть обусловлено мутациями в разных генах (локусная гетерогенность). В то же время, различные мутации в одном и том же гене в ряде случаев, могут детерминировать совершенно разные болезни (аллельная гетерогенность).

Кроме того, открытия второй половины XX в. свидетельствуют о том, что наряду с наследованием болезней по классическим законам, существуют многочисленные отклонения от них в наследовании патологических признаков. Стало известно так называемое девиантное наследование (наследование генов

только одного родителя); мутации генов соматических клеток, служащих причиной хронических заболеваний, не передающихся потомству; внеядерное наследование заболеваний (митохондриальные патологии) и т. д.

В общем виде рабочая классификация генетически детерминированных заболеваний по генетическому принципу может быть представлена в следующем виде:

- моногенные заболевания – болезни, обусловленные мутацией одного гена. Мутации могут возникать в смысловых или в регуляторных (0,1 % моногенных заболеваний) участках гена и приводить к нарушению процессов транскрипции и трансляции, что обуславливает уменьшение или прекращение синтеза белкового продукта или изменение его нормальной структуры и свойств. Чаще всего идентифицируются точковые мутации, представляющие собой однонуклеотидные замены и делеции:

- миссенс-мутации – замена нуклеотида в кодирующей части гена (при этом длина белка остается неизменной, меняется пространственная конфигурация, вследствие чего может нарушаться его функционирование);

- нонсенс-мутации – в результате замены нуклеотида в молекуле ДНК образуется стоп-кодон, прекращающий процесс трансляции (синтезируется укороченный белок с измененными функциями);

- сплайсинговые мутации – однонуклеотидные замены, возникающие на границе экзонов и интронов (нарушается процессинг первичного РНК продукта);

- нулевые мутации – замена нуклеотида с образованием стоп-кодона или сдвигом рамки считывания в 5-области гена (отсутствие белкового продукта).

Наряду с точковыми мутациями довольно часто причиной моногенных заболеваний являются делеции и инсерции сегмента ДНК размером от одного нуклеотида до субхромосомного сегмента. Описаны заболевания, возникновение которых связано с инсерцией транспозоноподобных мобильных элементов генома. Если количество делетированных или вставленных нуклеотидов не кратно трем, рамка счи-

тивания генетического кода сдвигается, что приводит к образованию белка, не способного нормально функционировать.

Еще один тип мутаций, наследуемых моногенно, – это дупликация определенного участка хромосомы, включающая один или несколько структурных генов. Как правило, они возникают в результате неравного кроссинговера гомологичных хроматид.

В последние годы у человека описан новый тип мутаций, так называемые, динамические мутации. Они характеризуются увеличением количества тринуклеотидных повторов в регуляторной или кодируемой частях гена. Большинство моногенных заболеваний, при которых выявляется эти мутации, связаны с патологией нервной системы.

Согласно современным оценкам моногенные заболевания выявляются у 2,4 % населения, а их средняя частота составляет 10:1000 новорожденных.

Митохондриальные болезни – группа наследственных заболеваний, обусловленных нарушением структуры и биохимических процессов в митохондриях. Эти заболевания могут быть детерминированы мутациями как в митохондриальном, так и в ядерном геноме. Кроме того, имеется еще один механизм возникновения болезней митохондрий – межгеномные сигнальные эффекты. Известно, что синтез митохондриальной ДНК (мтДНК) находится под контролем ядерных генов, мутации в которых могут привести к изменению количества копий ДНК митохондрий – тканеспецифические делеции и дупликации. При мутациях в ядерных геномах отклонения от менделеевских типов наследования не происходит, в отличие от мутаций в мтДНК. В настоящее время показано, что все митохондрии человека имеют материнское происхождение и получены человеком с материнской яйцеклеткой. Клетки больного с митохондриальной патологией могут содержать мутантные и нормальные митохондрии, распределение которых происходит случайно при клеточном делении – феномен гетероплазмии. Тяжесть клинических проявлений зависит от характера мутаций, содержания мутантной мтДНК в клетке, а также от энергетической потребности различных органов и тканей. Скорость мутирования мтДНК в 6–17 раз выше, чем ядерной

ДНК, что обуславливает высокую частоту спорадических случаев митохондриальных заболеваний.

Болезни геномного импринтинга – группа заболеваний с нетрадиционным типом наследования, в основе развития которых лежит различная экспрессия у потомства гомологичных генов, полученных от отца или матери, т. е. экспрессируется только отцовский или только материнский аллель гена, а другой оказывается функционально неактивным. Основную роль в возникновении геномного импринтинга играет избирательное метилирование цитозиновых оснований ДНК в процессе спермато- или оогенеза, в результате которого прекращается транскрипция импринтингового гена. Идентифицировано несколько механизмов возникновения болезней геномного импринтинга: однородительская дисомия – наличие двух хромосом с импринтинговыми генами, полученными от одного из родителей; хромосомные перестройки, затрагивающие импринтинговые гены, и точковые мутации в них. К настоящему времени выявлено не менее 30 импринтинговых генов, часто группирующихся в кластеры. Наиболее часто эффект геномного импринтинга выступает в качестве этиологического фактора при мутациях в хромосоме 15, с которыми связано развитие синдрома Прадера-Вилли и синдрома Энгельмана.

Болезни экспансии тринуклеотидных повторов – большой класс наследственных заболеваний, вызванных так называемыми «динамическими мутациями», которые характеризуются увеличением числа копий tandemных тринуклеотидных повторов в регуляторной или транскрибируемой части генов. Этот тип мутаций обнаружен пока только у человека. Для некоторых генов в норме характерно наличие определенного числа тринуклеотидных повторов, которое может варьировать от нескольких десятков до нескольких сотен. Появление клинических признаков наблюдается, когда количество повторов превысит критический для данного гена уровень. Заболевания этой группы характеризуются утяжелением клинических проявлений из поколения в поколение. По типу и локализации

тринуклеотидных повторов в структуре генов эти патологии делят на две группы:

Болезни экспансии тринуклеотидных повторов в транслируемой части гена – чаще всего CAG-повторов, кодирующих глутамин, что приводит к включению в структуру экспрессируемого белка полиглутаминового участка. Количество этих повторов у больных обычно невелика и колеблется в интервале от 40 до 80. При этом транскрипция и трансляция мутантных генов не нарушена, а патология возникает в результате неправильного функционирования увеличенного в размере белка. К этой группе заболеваний относят наследственные нейродегенерации, характеризующиеся поздним началом и неуклонным прогрессированием.

Болезни экспансии тринуклеотидных повторов в нетранслируемой части гена. При этих заболеваниях наблюдается большая экспансия повторов (от нескольких сотен до нескольких тысяч), а характер клинических проявлений и темп прогрессирования патологии зависит от функции мутантного белка. Значительное увеличение количества повторов делает ген нестабильным, как в соматических, так и в половых клетках. К заболеваниям этой группы можно отнести миотоническую дистрофию, синдром Мартина-Белл, атаксию Фридрейха.

Хромосомные синдромы – являются следствием структурных или количественных перестроек хромосом. Клинические проявления при хромосомных нарушениях наблюдаются с рождения, кроме того, до 50 % всех спонтанных аборт обусловлены наличием хромосомных перестроек у плода. Аномалии хромосом достаточно часто возникают, как в половых, так и в соматических клетках человека. Характер и тяжесть клинических симптомов при различных типах хромосомных перестроек определяется степенью нарушения генетического баланса и, как следствие, гомеостаза в организме человека. Недостаток хромосомного материала приводит к более выраженным клиническим проявлениям, чем его избыток. Для большинства хромосомных синдромов, обусловленных аномалиями аутосом, характерны пренатальная гипотрофия,

пороки развития двух и более органов и систем, олигофрения и снижение показателей физического развития. Для аномалий половых хромосом не характерно наличие выраженного интеллектуального дефицита, при этом возникает бесплодие и невынашивание беременности. Хромосомные синдромы делят на две группы:

геномные мутации – характеризуются увеличением полного набора хромосом (полиплоидии) или изменением количества хромосом одной из пар (анеуплоидии). У человека описано два вида полиплоидий: триплоидии и тетраплоидии с трех- и четырехкратным увеличением числа гаплоидных наборов хромосом, соответственно. Анеуплоидии могут выражаться в увеличении числа хромосом одной пары (трисомии и тетрасомии) и в их уменьшении (моносомии). Полиплоидии, как правило, не совместимы с жизнью, также как и моносомии по всем аутосомам. Наиболее частые геномные мутации у живорожденных – трисомии по аутосомам и половым хромосомам и моносомии по X- хромосоме;

хромосомные мутации – обуславливают различные изменения структуры хромосом. Они характеризуются значительным разнообразием и могут затрагивать одну или несколько хромосом. Выделяют внутри- и межхромосомные перестройки. Внутрихромосомными могут быть делеции, дупликации, транслокации и инверсии. Именно эти хромосомные перестройки при различных видах патологии человека. К межхромосомным перестройкам относятся транслокации и инсерции. Основными межхромосомными перестройками являются транслокации, которые могут быть реципрокными (сбалансированными – весь генетический материал сохраняется, а изменения касаются только расположения генов) и робертсоновскими (две хромосомы объединяются в одну).

Полигенные (мультифакториальные) заболевания – для их возникновения необходимо сочетанное действие нескольких генетических и средовых факторов. По мнению некоторых ученых мультифакториальные болезни составляют до 90 % всех хронических заболеваний человека, так или иначе связанных с генетическими факторами. Такие заболевания более сложны для

генетического анализа, поскольку обусловлены мутациями в нескольких генах, каждая из которых не является причиной патологии, а их появление сильно зависит от модифицирующего влияния факторов внешней среды и качества жизни. Частота встречаемости таких заболеваний обычно выше. Наблюдается огромный клинический полиморфизм заболеваний. Проявления этих заболеваний зависят от возраста больного, эндокринных влияний, питания и других факторов как внешней, так и внутренней среды (онкологические заболевания, бронхиальная астма, гипертония, сахарный диабет, ожирение, дерматозы, аутоиммунные заболевания и др.).

Для многих генных болезней известен первичный аномальный продукт гена. Эта группа заболеваний может быть классифицирована в зависимости от того, какие белки поражены:

- структурные белки (синдром Эмерса-Данлоса, при котором изменена молекулярная структура коллагена; миодистрофия Дюшенна (результат мутации гена мышечного белка дистрофина);

- транспортные белки (чаще всего мутации в генах, кодирующих мембранные транспортеры аминокислот; гемоглобинопатии, пернициозная анемия);

- белки-рецепторы (ахондроплазия – обусловлена мутацией в гене рецептора гормона роста);

- ферменты. Большинство генетических болезней относится к группе энзимопатий, связанных с врожденной недостаточностью определенного фермента, возникающей вследствие мутации кодирующего гена. Энзимопатии подразделяются на болезни накопления липидов, углеводов, аминокислот и других веществ. Единой классификации энзимопатий пока нет.

Большинство обычных болезней современного общества, такие как рак, атеросклероз, нейропсихиатрические болезни имеют существенный генетический компонент и также могут рассматриваться, как объекты классической генной терапии.

В настоящее время генная терапия внедряется и в область инфекционных заболеваний. Мишенью генной терапии стали

такие заболевания, как ВИЧ-инфекция, гепатит В, мононуклеоз, герпес и др.

К 2000 г. в мире зарегистрировано 380 клинических протоколов генной терапии. Из них 68 % приходится на генную терапию злокачественных новообразований; 13,9 % – на моногенные наследственные заболевания; 8,2 % – на терапию инфекционных болезней.

10.6. Генная терапия наследственных заболеваний

Недостаточность аденозиндезаминазы – моногенное аутосомно-рецессивное заболевание. Дети с этим наследственным дефектом гомозиготны по поврежденному гену и обычно не имеют аденозиндезаминазы (АОА), а гетерозиготные родители имеют пониженное содержание фермента. Ген ADA, кодирующий фермент аденозиндезаминазу, расположен на хромосоме 20. Этот фермент катализирует превращение аденозина в инозин и аммиак. Дефектность по этому ферменту приводит к тяжелому комбинированному иммунодефициту (SCID), связанному прежде всего с недоразвитием Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток. Часто это заболевание сопровождается нарушениями в развитии скелета.

Недостаточность аденозиндезаминазы успешно лечилась пересадкой костного мозга. Наблюдения за пациентами, получавшими такое лечение, показали, что у них собственные Т-клетки часто замещались донорскими, т. е. донорские клетки обладали селективными преимуществами перед собственными, больными. Именно поэтому в качестве первой модели для генной терапии была выбрана недостаточность аденозиндезаминазы. Мишенью генной терапии являются лимфоциты и клетки костного мозга.

Генная терапия недостаточности ADA была осуществлена путем модификации лейкоцитарных клеток. Это была первая успешная попытка применения терапии *ex vivo*. Она была осуществлена 14 сентября 1990 года. Эта дата считается днем рождения реальной генной терапии.

При генной терапии больной с недостаточностью ADA была использована следующая схема лечения. С помощью лейкофореза из периферической крови выделяли мононуклеарные клетки, затем их растили в культуре в условиях пролиферации Т-клеток. Для этого использовали антитела, стимулирующие деление Т-клеток, и фактор роста лимфоцитов – интерлейкин-2. Затем в пролиферирующие в условиях *in vitro* клетки вводили ретровирусный вектор, который содержал нормальный ген ADA. Через несколько дней трансдуцированные клетки крови вводили обратно пациентке. Процесс повторяли 7 раз на протяжении 10 месяцев. После введения генетически модифицированных клеток произошло заметное улучшение работы иммунной системы, наблюдалось повышение уровня аденозиндезаминазы. Примерно четверть лимфоцитов пациентки после терапии оказались носителями нормального гена ADA. За пациенткой наблюдали полгода и затем с интервалами 3–5 месяцев повторяли введение модифицированных клеток.

При данном протоколе генной терапии использовали зрелые Т-лимфоциты, средняя продолжительность жизни которых невелика, так как они постоянно замещаются в организме новыми. В связи с этим существует необходимость повторять введение генетически модифицированных клеток многократно.

В настоящее время генная терапия данного заболевания развивается в направлении использования стволовых клеток пациента. Это позволит значительно сократить количество введений модифицированных клеток за счет их многократных делений уже в самом организме и при достижении селективного и количественного преимущества модифицированных стволовых клеток над нативными сформирует достаточный уровень фермента в организме.

Наследственная тирозинемия первого типа – моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное дефектом гена фумарилацетоацетатгидроксилазы (FAH). Сопровождается нарушением функций печени разной степени выраженности вплоть до гепатоклеточной карциномы.

Разработка подходов к лечению данного заболевания ведется пока на животных. Создана технология получения трансгенных мышей с нокаутированным геном FАН, которые моделируют наиболее острую форму тирозинемии. Мышей, больных тирозинемией, подвергали терапии, направленной на уменьшение гепатотоксичности. Это удлиняло продолжительность жизни мышей, но впоследствии приводило к развитию гепатоцеллюлярной карциномы. То же самое наблюдается у пациентов, страдающих тирозинемией.

Была высказана гипотеза, что гепатоциты, в которых будет экспрессироваться нормальный фермент FАН, должны иметь преимущества в скорости роста по сравнению с гепатоцитами, в которых этот ген не функционирует. Действительно, трансплантация больной нокаутированной мыши всего 1000 гепатоцитов, взятых от здоровой мыши, экспрессирующей нормальный фермент FАН, приводила к потрясающему результату: в печени больного животного появлялось очень большое количество нормальных гепатоцитов. При введении через кровь гепатоцитов, трансфецированных здоровым геном, результат был аналогичным. Больное животное приобретало нормальную функцию печени. Таким образом, генетически модифицированные клетки, несущие здоровый ген, постепенно вытесняли немодифицированные гепатоциты.

Наследственная гиперхолестеролемия — моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, связанное с дефектом гена, кодирующего рецептор липопротеинов низкой плотности (LDL-R). Повреждение гена приводит к отсутствию данного рецептора на клетках печени и, как следствие, к накоплению в организме холестерина. Возникает ранний атеросклероз, что может привести к инфаркту миокарда.

У пациента, страдающего гиперхолестеролемией, была проведена частичная гепатозектомия. Известно, что неделящиеся гепатоциты не могут быть инфицированы ретровирусами. После гепатозектомии гепатоциты начинают пролиферировать и приобретают способность инфицироваться ретровирусами.

В гепатоциты, полученные из печени больного, с помощью ретровирусного вектора была введена кДНК гена нормального

рецептора LDL-R. После реинфузии рекомбинантных гепатоцитов через воротную вену в печень наблюдалось уменьшение содержания в крови липопротеинов низкой плотности (в частности, холестерина) и соотношения липопротеинов низкой плотности к липопротеинам высокой плотности. Это означает, что введенные клетки функционировали *in vivo* и осуществляли интернализацию и обмен холестерина.

Фенилкетонурия – моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, является следствием дефекта гена, кодирующего фермент фенилаланингидроксилазу, обнаруживается по наличию в моче кетокислоты фенилпирувата. В результате отсутствия фермента фенилаланин не может превращаться в тирозин, что является причиной гиперфенилаланинемии. Следствием этого дефекта является умственная отсталость, которую можно предотвратить путем специальной диеты.

Использование генной терапии при этом заболевании осложняется тем, что фенилаланингидроксилаза требует для своей активности кофакторов, которые синтезируются в печени. В настоящее время ведутся исследования на животных моделях, применимых для разработки методов генной терапии фенилкетонурии.

Гемофилия В – моногенное X-сцепленное заболевание свертываемости крови, вызываемое дефицитом фактора свертываемости крови IX, который синтезируется в печени и секретируется в кровь.

Были проведены успешные опыты на собаках с использованием стратегии *ex vivo* с доставкой в гепатоциты кДНК, кодирующей фактор IX. Удалось добиться синтеза фактора IX в количествах, составляющих 0,1 % от нормального количества фактора IX в плазме крови.

Для повышения концентрации фактора IX были предприняты попытки терапии *in vivo* с доставкой кДНК в гепатоциты с помощью аденовирусного вектора. Оказалось что такой вектор может трансдуцировать гепатоциты *in vivo* без гепатэктомии. При этом рекомбинантный вектор вводили в воротные сосуды подопытных собак, дефицитных по фактору IX. Концентрация фактора у больных собак возрастала от 0 до 300 % от первич-

ного уровня, и кровь этих животных нормально свертывалась. Однако через несколько дней уровень фактора IX в крови начинал падать, но при этом оставался выше исходного в течение последующих двух месяцев. Эти эксперименты дают основание надеяться, что подобный подход, при условии его усовершенствования, может быть применен и к больным гемофилией В.

Гемофилия А – моногенное X-сцепленное заболевание свертываемости крови, вызванное мутацией гена, кодирующего фактор свертываемости крови VIII. Исследования в области генной терапии гемофилии А осложняются тем, что ген имеет большие размеры. Это препятствует встраиванию полноразмерной кДНК в ретровирусные векторы. Кроме того, кДНК этого фактора содержит ингибиторные последовательности, которые препятствуют экспрессии ретровирусного генома.

Дополнительные молекулярно-генетические исследования показали, что фактор VIII построен по доменному принципу. Он состоит из 6 доменов A1-A2-B-A3-C1-C2. Домен В можно исключить из белка без потери функциональной активности. Следовательно, можно использовать укороченный ген, совместимый по длине с емкостью имеющихся векторов.

Появились сообщения об успешном введении мышам укороченного гена фактора VIII в составе ретровирусного вектора. В результате достигается терапевтический уровень фактора в крови.

Муковисцидоз – моногенное аутосомно-рецессивное заболевание легких, вызванное мутацией гена CFTR, являющегося регулятором трансмембранной проводимости клеток легочного эпителия. Наличие мутации приводит к хроническим инфекциям, воспалениям и постепенному разрушению дыхательного аппарата. Показано, что замена 6–10 % клеток легочного эпителия трансфицированными клетками позволит восстановить нормальные транспортные функции трансмембранных каналов, обеспечивающих перенос ионов хлора.

Использование ретровирусных векторов при генной терапии данного генетического заболевания неэффективно, поскольку они плохо инфицируют легочный эпителий. Взамен используют аденовирусы и липосомы. Эксперименты по применимости и безопасности подобных подходов проверены на мышах, нокаутированных по CFTR гену. Однако они не всегда давали ожидаемы результат. Так, использование аденовирусных векторов довольно часто приводило к развитию различного рода воспалительных реакций.

Важной проблемой генной терапии муковисцидоза являются сложности, связанные с доставкой терапевтического гена непосредственно к клеткам легочного эпителия. Доставка вектора осложняется наличием многочисленных барьеров, образованных серозной оболочкой, гликокаликсом. Основу этих барьеров составляют плотные адгезионные контакты между клетками, которые не позволяют крупным молекулам проходить через слои клеток. Были разработаны два подхода, направленные на решение этой проблемы. Один из них называется «модификация хозяина». Он предполагает использование различных веществ (оксиданты, детергенты), которые вызовут неспецифическое повреждение плотных контактов, что позволит генотерапевтическим векторам проходить сквозь слои клеток к месту назначения. Однако этот подход осложняется сложностью расчета концентраций этих веществ.

Второй подход заключается в модификации вектора, который включает в себя определенный лиганд к рецептору на поверхности клеток легочного эпителия.

Взаимодействие лиганда с рецептором обычно приводит к интернализации вектора вместе с рецептором внутрь клетки. В качестве такого рецептора был выбран трансмембранный рецептор P2Y₂-R, семь раз пересекающий плазматическую мембрану. Этот рецептор участвует в запуске каскада воспалительных реакций в полости легких. В качестве лиганда использовались либо моноклональные антитела к этому рецептору, либо природный лиганд – биотин УТФ.

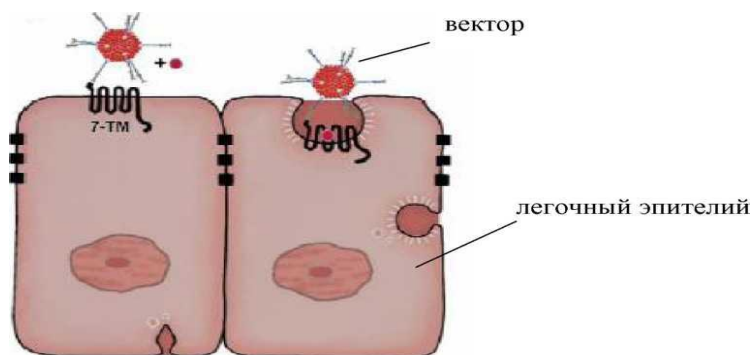


Рис. 24. Модификация вектора для внедрения в клетку-мишень

Мышечная дистрофия Дюшенна – это рецессивное Х-сцепленное заболевание, обусловленное многочисленными делециями и инсерциями в области гена, кодирующего белок дистрофин. Дистрофин локализуется в сарколемме мышечных волокон и ответственен за стабилизацию плазматической мембраны миоцитов. Дисфункция этого белка приводит к дестабилизации мембран и последующей дегенерации мышечной ткани. Болезнь начинает проявляться в детстве, и генная терапия должна проводиться в это же время.

Существуют животные, которых используют в качестве модели заболевания – мыши и собаки с аналогичной болезнью. В процессе исследований подсчитано, что по крайней мере 10 % мышечных клеток должны получить ген дистрофина, чтобы лечебный эффект был достигнут.

Использованы подходы с доставкой кДНК гена дистрофина с помощью аденовирусов. Кроме того, применяли «голую» кДНК, содержащую ген дистрофина. Преимущество применения аденовирусов в качестве векторов заключается в их тропизме к неделящимся мышечным клеткам. В связи с тем, что ген дистрофина очень большой по длине (14 т.п.н.) и белок, который он кодирует также велик (4000 а.о.) исследователи пытаются использовать укороченные, но тем не менее функционально активные формы белка. Эксперименты на мышинных моделях, которые имеют дефектный ген дистрофина, показали,

что от 5 до 50 % мышечных клеток экспрессировали усеченный белок дистрофин. Этого было достаточно для сведения к минимуму мышечной дегенерации.

Существуют данные о клинических испытаниях генетической конструкции, несущей ген дистрофина, для терапии больных мышечной дистрофией Дюшенена. Больные дети после инъекции в мышцы такой конструкции приобретали способность двигаться. Однако, терапевтический эффект был временным.

Наследственные повреждения сетчатки. Из различных наследственных форм дегенерации сетчатки наиболее охарактеризован пигментозный ретинит – чаще всего, моногенное аутосомно-рецессивное заболевание. Причиной этой болезни являются мутации в одном или нескольких из семи RP-генов. Пять из них экспрессируются исключительно в фоторецепторных клетках. Однако фоторецепторные клетки и пигментные эпителиальные клетки находятся в непосредственной близости и функционально взаимосвязаны. Дефекты в генах, экспрессирующихся в пигментных клетках, могут также вызывать дегенеративные повреждения сетчатки. Введение в клетки нормальных копий дефектных генов или генов, способствующих клеточному выживанию, может блокировать дегенеративный процесс и таким образом сохранять зрение.

Глаз имеет множество преимуществ как мишень для осуществления генотерапевтических процедур. Он легко доступен, его ткани могут быть исследованы *in vivo* с помощью офтальмоскопии. Кроме того, имеется несколько гематоофтальмических барьеров, которые могут концентрировать генотерапевтические векторы в целевой области и ограничивать их распространение вне глаза.

Однако, генная терапия наследственных повреждений сетчатки имеет сложности, связанные с необходимостью длительной экспрессии и правильного регулирования транскрипции гена. Проводятся многочисленные эксперименты по генной терапии различных наследственных моногенных ретинитов. Исследования по восстановлению фоторецепторных

клеточных популяций на мышинных моделях пока не привели к должным результатам. Введение терапевтического гена способствовало восстановлению нескольких слоев фоторецепторов, однако через несколько недель трансформированные клетки погибали.

Лучших результатов достигли с генной терапией пигментных клеток. В частности удалось восстановить зрение у мышей с ретиinitом, в основе которого лежит дефект гена, кодирующего фермент, расщепляющий липофусцин. Также успешными можно назвать генотерапевтические стратегии, использующие в качестве трансдуцированного гена факторы роста для фоторецепторных клеток – нейротрофический фактор мозгового происхождения (BDNF) и цилиарный нейротрофический фактор (CNTF).

10.7. Онкологические заболевания

Раковые заболевания и создание эффективных методов их лечения – одна из основных проблем современного общества. Не случайно задачам диагностики и лечения рака уделяют большое внимание во всех развитых странах. Поэтому скорость приближения к реальной генной терапии рака весьма значительна. Это связано с двумя факторами, один из которых научный, а другой социально-этический. Первый заключается в том, что с опухолевыми клетками сравнительно легко работать *ex vivo* и *in situ*. Это их очень большое преимущество, поскольку они легко размножаются.

Второй фактор связан с тем, что рак настолько опасен и в большинстве случаев так быстро прогрессирует, что применение новых подходов для спасения обреченных на близкую смерть людей совершенно оправданно с этической точки зрения.

Рак – это, как правило, следствие многоступенчатых изменений клетки. Сложность, связанная с участием множества генов и их продуктов в опухолевом процессе, вызывала сомнения в эффективности генной терапии раковых заболеваний. Однако существуют многочисленные

эксперименты, показывающие, что компенсация единственного гена – супрессора может приводить к подавлению опухолевых свойств клеток.

В настоящее время существует несколько потенциальных стратегий борьбы с раковыми опухолями методами генной терапии.

Усиление противоопухолевой активности клеток иммунной системы. Первые клинические исследования по генной терапии рака начались в 1989 году. В качестве объекта были использованы Т-лимфоциты, инфильтрующиеся в опухоль (ТИЛ). ТИЛ брали у онкологических пациентов и с помощью ретровирусного вектора вводили в них ген устойчивости к неомизину. Модифицированные ТИЛ растили в культуре в присутствии фактора роста Т-лимфоцитов IL-2. Затем Т-лимфоциты вводили пациентам. Клинические исследования показали безвредность введения генетически модифицированных Т-лимфоцитов. Однако, осталось неясным, насколько специфично лимфоциты мигрируют в опухоль.

Дальнейшие эксперименты велись также с ТИЛ, но в качестве терапевтического гена брали ген, кодирующий фактор некроза опухолей (ФНО). ФНО представляет лимфокин, который оказывал сильный противоопухолевой эффект, что было подтверждено в опытах на мышах. Однако при экстраполировании этих экспериментов на человека, введение ФНО оказывалось очень токсичным для организма в целом. Но несмотря на первые неудачи, клинические испытания с использованием ТИЛ для генной терапии опухолей активно ведутся вплоть до настоящего времени, также как и дискуссии на тему эффективности такого подхода.

Другой подход предполагает изменение функционирования клеток-эффекторов при помощи генов, кодирующих химерные рецепторы. Такие рецепторы включают вариабельные домены противоопухолевых моноклональных антител и константные участки цепей Т-клеточного рецептора. При экспрессии таких рецепторов распознавание опухоли и последующая активация цитотоксических Т-клеток не зависят от антигенов гистосовместимости.

Еще одно направление связано с клонированием и размножением *ex vivo* Т-лимфоцитов, несущих гены, которые кодируют Т-клеточные рецепторы, направленные против опухолевых антигенов.

Увеличение иммуногенности опухолевых клеток, например, путем введения генов, кодирующих продукты, обеспечивающие распознавание опухоли клетками иммунной системы (цитокиновых генов, генов, кодирующих главный комплекс гистосовместимости и др.). Небольшое число попыток генотерапии злокачественных опухолей связано с введением в клетки опухоли генов IL-2 или ФНО. Затем эти клетки вводили в организм больного, что обеспечивало иммунологическую реакцию на опухолевые клетки. Такие манипуляции проводили для лечения больных злокачественной меланомой, раком почки.

Проводятся работы по введению в опухолевые клетки генов, кодирующих белки-иммуностимуляторы. Клетки выращивают в культуре, затем облучают и вводят обратно пациенту в надежде вызвать системный иммунный ответ. Он, с одной стороны, уничтожает уже существующие опухолевые клетки, а с другой – предохраняет от возникновения новых опухолей данного типа. Повышение концентрации цитокинов в непосредственной близости от опухолевых клеток стимулирует мигрирующие в опухолевый очаг Т-клетки. Стимулирующие эффекты наблюдались как у опытных животных, так и у пациентов-волонтеров, получивших такую терапию.

Представленные исследования дали начало развитию нового направления противоопухолевой терапии – терапии с применением индивидуальных противоопухолевых вакцин. Первые эксперименты проводились на мышах. Клетки опухолей трансформировали генами таких цитокинов, как: IL1-1, IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , GM-CSF, гамма-интерферон. Наблюдали, что у животных, которым вводили генетически модифицированные опухолевые клетки, происходило торможение опухолевого роста. В ряде случаев животные становились невосприимчивыми к возникновению новых опухолевых очагов при введении немодифицированных опухолевых клеток. Таким образом, трансдуцированные клетки действовали, как

противоопухолевые вакцины. Это послужило основанием для испытания подобных подходов на людях. В настоящее время предпринимаются попытки «включать» гены цитокинов с помощью ретровирусных векторов в клетки меланомы, различных карцином, нейробластомы, рака груди.

Другой подход в создании противораковых индивидуальных вакцин заключается в следующем. Ранее считалось, что для узнавания и последующей иммунной реакции достаточно только взаимодействия Т-клеточного рецептора и комплекса пептида с молекулами HLA I класса. Оказалось, что для полноценного иммунного ответа необходимо наличие дополнительного сигнала. Этот сигнал образуется путем взаимодействия молекулы B7 на поверхности антигенпредставляющей клетки и ее рецептора на поверхности Т-клетки, называемого CD28 антигеном.

Причиной того, что опухолевые клетки не узнаются клетками иммунной системы может быть то, что они обычно не экспрессируют на поверхности B7. В связи с этим были предприняты попытки стимулировать противоопухолевый ответ путем введения гена B7 в опухолевые клетки. Подобным образом были модифицированы меланомные мышинные клетки. Их введение мышам с меланомой приводило к деградации опухоли, и ни одна из мышей, получивших дозу клеток модифицированной меланомы, не погибла. Более того, если мышам, вакцинированным модифицированными меланомными клетками, вводили немодифицированные клетки меланомы, то 89 % мышей оказывались защищенными от развития опухоли. Это означает, что вакцина способна защищать от метастазирования.

Еще один потенциальный способ противоопухолевой терапии связан с блокадой механизмов, с помощью которых опухолевые клетки избегают уничтожения клетками иммунной системой. Многие опухоли синтезируют большие количества инсулинподобного ростового фактора – IGF-1. Экспрессию этого гена можно подавить путем введения в опухолевые клетки генетических конструкций, кодирующих антисмысловую РНК, т. е. РНК, комплементарную по отношению к мРНК гена IGF-1.

Такая РНК взаимодействует с мРНК этого ростового фактора и препятствует ее трансляции. Опухоли, образуемые такими модифицированными клетками, разрушаются иммунной системой.

Восстановление нормального фенотипа клеток. Для этого осуществляют блокаду экспрессии онкогенов с помощью внутриклеточной иммунизации, например, путем введения в клетки конструкций, программирующих синтез антисмысловых РНК или антител к онкобелкам. Ведутся исследования по использованию внутриклеточных антител для инактивации рецепторов ростовых факторов, которые вовлекаются в опухолеобразование. К числу таких рецепторов относится ErbB2. Он принадлежит к семейству рецепторов эпидермального ростового фактора EGFR. Функционально это семейство представляет собой семейство рецепторов с тирозинкиназной активностью, которая имеет ключевое значение для регуляции жизнедеятельности клетки. Этот рецептор повышенно экспрессируется на клетках ряда опухолей (карцинома яичника, молочной железы). На культурах клеток продемонстрировали, что внутриклеточные антитела к этому рецептору, заякоренные в эндоплазматическом ретикулуме, предотвращали его появление на поверхности клеток и приводили к приостановке клеточной пролиферации. Наблюдали и обращение трансформированных клеток к нетрансформированному фенотипу.

Кроме того, проводили эксперименты и с цитоплазматическими внутриклеточными антителами. Для этого кодирующую последовательность лишали той части, которая отвечает за экспрессию лидерного пептида. Использовали, в частности, антитела против продукта гена *ras*. Это p21ras белок, связывающий гуанозиннуклеотиды и вовлеченный в многочисленные процессы контроля клеточного роста и дифференцировки.

Введение в опухолевые клетки генов онкосупрессоров, таких как p53, также способствует восстановлению нормального фенотипа опухолевых клеток.

Направленное убийство опухолевых клеток. Это может осуществляться путем введения генов, кодирующих токсины под контролем промоторов, специфически экспрессирующихся в опухолевых клетках. Например, гена, кодирующего дифтерийный токсин.

Другой недавно разработанный генотерапевтический подход заключается в использовании штамма аденовируса, кодирующего дефектный белок E1 В. Этот белок с молекулярной массой 55 кДа в обычных условиях обладает сродством к одному из основных онкосупрессоров p53. При взаимодействии с ним он блокирует его действие. В результате генетического дефекта E1В в сайте взаимодействия с p53 при попадании в нормальные клетки не происходит нарушения активности p53 и дальнейшего развития вируса. Большинство опухолевых клеток несет мутации именно в гене, кодирующем белок p53, поэтому при попадании аденовируса в эти клетки блокады репликации аденовируса не происходит. Вирус размножается и осуществляет свое цитопатическое действие. Этот подход был отработан на животных моделях и в настоящее время используется в клинических целях, обычно в сочетании с дополнительной химиотерапией.

Терапия, инициирующая апоптоз опухолевых клеток. Апоптоз клетки можно запустить с помощью многих факторов. Например, апоптоз можно вызвать, усилив чувствительность клетки к повреждениям ДНК. Этому способствует введение генетических конструкций, усиливающих или запускающих подавленную или полностью отсутствующую в опухолевых клетках экспрессию клеточных белков (p53, E2F-1).

К запуску самоубийства клеток приводит введение непосредственно проапоптотических генов – генов, кодирующих предшественников каспаз; генов, чьи продукты блокируют ингибиторы апоптоза (IAP); генов, кодирующих участников митохондриального пути апоптоза (Araf-1, Bax).

Ведутся эксперименты по блокаде антиапоптотических белков (Bcl-2, Bcl-X_L) с помощью внутриклеточных антител, антисмысловых олигонуклеотидов и интерферирующей РНК. Последние исследования показывают, что причиной боль-

шинства случаев образования карциномы прямой кишки является повышенная экспрессия Bcl-2, способствующая снижению экспрессии онкосупрессора p53.

Введение в опухолевую массу лигандов для мембранных рецепторов апоптоза приводит опухолевые клетки к гибели. Наилучшие результаты в доклинических исследованиях получены при использовании рекомбинантного лиганда TRAIL, который, в отличие от Fas-лиганда и TNF-а, не оказывал токсичного действия на окружающие ткани. Часто многие опухолевые клетки имеют пониженную экспрессию рецепторов апоптоза, в частности DR4-рецепторов для TRAIL. Поэтому генную терапию с помощью TRAIL предваряют терапией, способствующей повышению экспрессии DR4-рецепторов (повышенная экспрессия p53, блокада ингибиторов апоптоза IAP и Smac/Diablo).

Большинство опухолей устойчивы к действию цитотоксических препаратов. Одной из составляющих, способствующему этому, а также препятствующему запуску апоптоза, является каскад реакций, индуцированный фактором транскрипции NF-κB. Поэтому была разработана соответствующая генная терапия протеолитически стабильным «суперрепрессором» этого каскада IκB, который повышает чувствительность некоторых видов опухолей к химиотерапии, TNF-а. Подобный эффект оказывают ингибиторы протеасом, протеинкиназы C.

Одним из важных подходов в рамках апоптозной стратегии генной терапии является «суицидальная» GDEPT-терапия (gene directed enzyme prodrug therapy). Эта терапия способствует повышению чувствительности раковых клеток к апоптозу с помощью нетоксичных предшественников противоопухолевых препаратов.

Апоптоз пролиферирующих клеток можно вызвать с помощью препарата ганцикловир, который оказывает токсичное действие на быстроделяющиеся клетки. Он представляет собой активированный продукт гена тимидинкиназы вируса простого герпеса.

Для апоптоза опухолевых клеток их сначала заражают вирусом простого герпеса, несущего ген тимидинкиназы, а затем через некоторое время вводят ганцикловир. Тимидинкиназа вируса фосфорилирует ганцикловир.

Киназы клетки-хозяина присоединяют к фосфорилированному ганцикловиру трифосфат, а трифосфаты затем включаются во вновь синтезированную ДНК в процессе синтеза ДНК при клеточном делении. Включившись, они обрывают дальнейший синтез ДНК, терминируют его, что приводит к запуску апоптотических сигналов. В результате клетки, содержащие герпесную тимидинкиназу, погибают в присутствии этих агентов. Через межклеточные контакты ганцикловиртрифосфат может попасть в другие опухолевые клетки и привести к их гибели.

Подобные эксперименты вначале велись на животных моделях. Клетки мышинных фибробластов, продуцирующие рекомбинантные ретровирусы подсаживались прямо в опухоль в мозге. Рекомбинантные ретровирусы содержали ген HSVtk. Поскольку ретровирусы интегрируют в митотически активные клетки, ген тимидинкиназы оказывался преимущественно в опухолевых клетках, тогда как здоровые клетки из тканей, окружающих опухоль, оставались вне вирусной атаки и, следовательно, без гена тимидинкиназы герпеса.

На крысах был получен великолепный результат. От 30 до 60 % опухолевых клеток в мозге оказывались обладателями гена HSVtk после такой обработки. У 80 % подопытных крыс опухоли разрушались в присутствии ганцикловира. Гибель всей опухоли можно объяснить эффектом рядом стоящего (bystander). Погибают не только клетки, включившие ген тимидинкиназы герпеса, но и соседние с ними клетки, в которых этого гена нет, но которые делятся. По-видимому, дело в межклеточных взаимодействиях. Фосфорилированный ганцикловир может диффундировать от клеток, в которых он образуется за счет работы вирусной тимидинкиназы, к соседним клеткам. Если соседние клетки делятся, то они будут его включать в состав ДНК и погибать. Экспериментально показано, что если 10 % клеток опухоли содержит ген тимидинкиназы, то

опухоль может быть уничтожена полностью. И при этом у животных не наблюдается токсических эффектов.

Полученные результаты позволили начать испытания на больных раком мозга, которым инъецируют мышинные фибробласты, продуцирующие рекомбинантные ретровирусы, содержащие ген HSVtk, а затем внутривенно вводили ганцикловир.

Вопросы для самоконтроля:

1. Дайте общую характеристику генной терапии.
2. Какие существуют виды генной терапии?
3. Охарактеризуйте способы введения терапевтической генетической конструкции в организм.
4. Что такое стволовые клетки?
5. Каковы особенности позитивной генотерапии?
6. Внехромосомная экспрессия введенного гена.
7. Дайте характеристику негативной генотерапии.

11. СВЯЗЬ ДНК-ТЕХНОЛОГИИ С НОВЫМИ ОБЛАСТЯМИ ИССЛЕДОВАНИЙ

Наследственная информация живых существ передается химическими сигналами, и ее материальным носителем у организмов является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). В результате расшифровки ДНК возникла новая область науки и технологии – ДНК-технологии. Это новый раздел экспериментальной биологии. Его появление стало возможным благодаря работам многих исследователей в различных областях биохимии и молекулярной генетики и, в результате, изменило наше представление о гене.

Концепция гена пронизывает все области биологии, являясь основой и базой биологических наук. Развитие концепции гена началось с работ Менделя, Бэтсона и Иогасена и с классического определения «один ген – один признак». Вершина развития молекулярной генетики 1960-х годов, завершилась классическим представлением о гене как цистроне, а также моделью Ф. Жакоба и Ж. Моно регуляции активности полицистронных оперонов бактерий. Работы С. Бензера по изучению тонкой структуры гена *rII*-области бактериофага T4 продемонстрировали предел разрешающей способности генетического анализа в применении к бактериофагам и одновременно невозможность получения таких же точных результатов при его использовании для исследования сложно устроенных организмов с более продолжительным жизненным циклом. В модели гена 1960-х годов регуляторная часть предшествует структурной и определяет уровень его экспрессии через взаимодействие с регуляторными белками. Структурная часть гена кодирует единственную полипептидную цепь белка или молекулу РНК и коллинеарна белковому продукту, т.е. последовательность нуклеотидов гена однозначно определяет и соответствует последовательности аминокислот в кодируемом этим геном белке. Классическая модель гена 1960-х годов предусматривает его четкие границы и локализацию в хромосоме. Изменения в первичной структуре гена и его перемещения в геноме могли быть следствием непредсказуемых

мутаций и должны были приводить к нарушению его функционирования.

Развитие ДНК технологий с использованием методов рекомбинантных ДНК изменили эти представления. Сегодня совершенно ясно, что ген не всегда колинеарен РНК или белку, которые закодированы в последовательности его нуклеотидов – одна и та же последовательность нуклеотидов ДНК может кодировать разные полипептидные цепи, а нестабильность генов может быть генетически запрограммированной. Большинство генов эукариот обладает мозаичной структурой, состоящей из кодирующих и некодирующих последовательностей нуклеотидов – экзонов и интронов. Лишь в результате сплайсинга предшественников мРНК заключенные в них интроны вырезаются и восстанавливается колинеарность гена, мРНК и белкового продукта. Удаление избыточных последовательностей в результате сплайсинга происходит не только на уровне РНК, но и на уровне полипептидных цепей. Не менее удивительными, являются и механизмы редактирования кодирующего потенциала РНК на посттранскрипционном уровне.

За время активного применения ДНК технологий представления о гене существенно изменились. Но понятие гена в прежнем классическом смысле осталось, остался основной принцип, заложенный в понятие гена как фрагмента нуклеиновой кислоты, в последовательности нуклеотидов которой закодирована информация о последовательности нуклеотидов в другой нуклеиновой кислоте или аминокислотной последовательности в белке. Эта формулировка по смыслу близка к классическому определению «один ген – один признак» и в новейшем определении один ген – та часть генома, которая кодирует фенотипический признак.

ДНК-технологии позволяют исследовать и направленно изменять материал наследственности на разных уровнях его организации – геном, хромосомном, геномном, популяционно-генетическом. Именно благодаря развитию ДНК технологий становится все более очевидным определенное единообразие стабильности и изменчивости материала наследственности, как

на уровне отдельной нуклеотидной последовательности, так и в совокупности организмов, образующих общий генофонд.

Необходимо подчеркнуть, что все методы ДНК технологий, связанные с созданием новых генных конструкций и новых организмов основаны на искусственной имитации процессов, реально существующих в живой природе. Исследователи не придумывают по сути ничего нового – они обучаются использованию приемов, многократно реализованных в процессе Эволюции живых организмов и лежащих в основе «трех китов» филогенеза – изменчивости, наследственности и отбора. Таким образом, конец XX в. – начало XXI в. является действительно переломным моментом всего развития биосферы – переходом к активному вмешательству человека в совокупность материала наследственности биосферы, созданию новых вариантов с использованием приемов, стихийно наработанных в процессе эволюции за миллионы лет до появления человека.

По-видимому, в современной биологии, во всем диапазоне ее областей – от физиологии клетки до механизмов высшей нервной деятельности, не осталось ни одной, в которой бы не нашли своего применения ДНК-технологии, биоинформатика, протеомика, метаболомика. Фактически созданы предпосылки для качественных перемен не только в прикладной биологии и сельском хозяйстве, но и в жизни человечества. Разработка ДНК технологий во многом определила справедливость прогноза относительно того, что в XXI столетии решающую роль в развитии и существовании мирового сообщества будет играть биология. Ее достижения, наряду с биоинформатикой, позволят вплотную подойти к формированию ноосферы, обеспечивающей удовлетворение возрастающих потребностей человечества при сохранении окружающей среды. Образование новых сочетаний генов и их частей в природных условиях, проходит проверку естественным отбором. Только он может оценить жизненную значимость таких преобразований геномов. Использование в лабораторных условиях основных генетических принципов, лежащих в основе природных перемещений генов, позволило человечеству разработать более эффективные системы передачи генетической информации

между организмами и приступить к беспрецедентным по информативности исследованиям генетических явлений на молекулярном уровне. Произошло рождение нового направления в биологии – ДНК-технологий, значение которого не ограничивается результатами тех или иных фундаментальных и прикладных исследований. Именно с этого момента начинается новый этап эволюции биосферы Земли, и, к сожалению, мы в настоящее время не все в состоянии предвидеть.

Объединение несколько новых областей исследований – ДНК-технологии, биоинформатики, метаболомики, протеомики – обусловлено тесным взаимодействием между ними и взаимозависимостью их развития. Исследования генетического материала микроорганизмов показали, что во многих случаях отсутствуют межвидовые барьеры в передаче генов. Это подготовило благоприятную почву для введения рекомбинантных ДНК в многоклеточные организмы. Идея введения чужеродных генов в геном многоклеточного организма ничем существенно не отличается от идей генетической трансформации бактериальных клеток гетерологичными последовательностями нуклеиновых кислот.

С развитием ДНК-технологии появились трансгенные животные и растения. Анализ трансгенных организмов позволяет непосредственно изучать генетический материал, взаимное влияние генов и их функциональное значение, а также анализировать экспрессию генов в новом генетическом окружении. Получены экспериментальные данные о возможности обмена генетической информацией как между отдельными генами внутри одного организма, разными организмами одного и того же вида, так и между организмами разных таксономических групп. Обычно у высших организмов такой «горизонтальный» перенос генетической информации является крайне редким событием, но у микроорганизмов он достаточно распространен, что и используется практически во всех методах ДНК-технологий. Гены, появившиеся в геноме в результате единичного события горизонтального переноса, обычно будут расположены в непосредственной близости друг от друга, во

всяком случае пока их положение на хромосоме не изменится в результате рекомбинационных событий. Вообще существует тенденция к сохранению близости (в смысле расстояния на хромосоме) функционально связанных генов.

В общем, ДНК-технологии – это методы получения рекомбинантных ДНК, объединяющих последовательности разного происхождения, искусство использования знаний, методов и техники физико-химической биологии и молекулярной генетики для конструирования организмов с заданными наследственными свойствами, умение поставить и методически реализовать генно-инженерную задачу – получить рекомбинантную ДНК с последующим включением ее в реципиентную клетку или осуществить перенос целых хромосом от клеток-доноров в клетки-реципиенты. Они включают также методы клонирования ДНК, идентификацию генов, методы секвенирования и синтеза олигонуклеотидов, направленного мутагенеза ДНК, оптимизацию экспрессии синтезированных молекул ДНК, технологию рекомбинантной ДНК и методы введения рекомбинантной ДНК в живые клетки.

Иногда понятия ДНК-технологии и «биотехнология» отождествляются, хотя, несомненно, ДНК-технология – более узкое понятие и представляет собой один из разделов науки биотехнологии.

Практическое использование рекомбинантных ДНК различного происхождения составляет основу ДНК-технологий. Теоретически все 30–40 тысяч структурных генов человека и животных доступны экспериментальному анализу. Поэтому желательны идентификация всех генов, установление карты тканеспецифичности их экспрессии, идентификация регуляторных областей генов; построение глобальной регуляторной карты генома, классификация генов по структурным и биохимическим функциям их продуктов, идентификация всех потенциальных белков и доменов, анализ распределения полиморфизма и мутаций, определение эволюционных и популяционных взаимосвязей, создание коллекции генетического материала и т. д.

11.1. Метабономика

Для создания организмов с новыми свойствами существует несколько путей. Один из них – объединение разных метаболических путей в одном организме с помощью конъюгации. Другой способ расширить их катаболические возможности – модификация генов, кодирующих ферменты того или иного метаболического пути. Используя ДНК-технологии, в частности, рекомбинантные ДНК, можно направленно изменять метаболизм организмов, вводя в них новые гены или модифицируя уже существующие. В результате генетических манипуляций организм приобретает новые метаболические пути, например, способность к синтезу нового фермента, что можно использовать для получения *in vivo* низкомолекулярных соединений – витаминов, аминокислот, красителей, антибиотиков, предшественников различных биополимеров и т. д. Такой организм становится «фабрикой» или биореактором по производству полезных метаболитов. Основная цель этих изменений состоит в создании рекомбинантного организма (биореактора) с новыми метаболическими путями или с новой ферментативной активностью, способного превращать существующий субстрат в ценный продукт, который раньше обычно получали только сочетанием химических и микробиологических методов. Некоторые примеры использования генетически модифицированных микроорганизмов рассмотрены ниже.

Для направленного изменения микроорганизмов, синтезирующих определенные метаболиты, есть такие пути:

- можно изменить активность или содержание одного или нескольких ферментов того или иного биосинтетического пути с тем, чтобы увеличить продукцию нужного метаболита;
- в прокариотический геном можно ввести чужеродные гены кодирующие ферменты, которые, используя эндогенный метаболит качестве субстрата, обеспечат синтез метаболита, изначально не индуцируемого хозяйской клеткой.

Эти манипуляции представляются достаточно простыми, их иногда называют ДНК метабономикой. Из одного

микроорганизма в другой переносят гены, ответственные за какую-то часть метаболического пути, так, что второй микроорганизм приобретает способность синтезировать новые метаболиты.

Микроорганизмы можно не только использовать как «фабрики» для синтеза белков типа рестриктаз, но и получать с их поморю новые продукты, изменяя метаболизм бактериальных клеток ведением в них чужеродных генов или модификацией уже существующих. Можно создавать рекомбинантные микроорганизмы, способные синтезировать самые разные низкомолекулярные соединения: L-аскорбиновую кислоту, краситель индиго, аминокислоты, антибиотики, мономерные единицы различных биополимеров. Общая стратегия при этом состоит во введении в организм хозяина специфических генов, клонированных в подходящем векторе, которые кодируют один или несколько ферментов, катализирующих не свойственные микроорганизму метаболические реакции или влияющих на осуществляемый им в норме биосинтез определенных соединений. Этот подход поможет создать необычные, более эффективные пути синтеза самых разных соединений.

Доступность многих геномов позволяет изучать эволюцию метаболических путей. Среди частных наблюдений упомянем редукцию цикла трикарбоксильных кислот до простого разветвленного пути у паразита *H. influenzae*. Было показано, что системы репарации во всех геномах состоят из ограниченного набора доменов, в основном АТФаз, нуклеаз, ДНК-связывающих и адапторных доменов. Существенное влияние на системы репарации оказывают внешние условия, известно их влияние на структурную организацию хроматина у эукариот.

Сравнение геномов позволяет анализировать два интересных эффекта: неортологичные замещения и горизонтальный перенос генов.

Хорошо известен горизонтальный перенос генов из митохондрий в ядерный геном эукариот. Были установлены многочисленные горизонтальные переносы генов системы репарации из бактериальных геномов в эукариотические, и, по-

видимому, исходными геномами были геномы митохондрий. Недавно была предложена альтернативная гипотеза, согласно которой источником бактериальных генов в геномах эукариот является ДНК бактерий, которыми питались ранние простейшие. Она может быть подтверждена обнаружением эукариотических генов, ближайшими гомологами которых являются гены бактерий не из группы альфа-протеобактерий (к которой принадлежат предки митохондрий). Наконец, есть примеры горизонтального переноса генов от эукариот к прокариотам. В то же время, направление переноса чаще бывает трудно определить.

Кроме понимания фундаментальных молекулярных процессов, лежащих в основе жизни, определение нуклеотидной последовательности геномов имеет и практическое применение. Например, определение того, какие именно метаболические пути и шунты имеются у патогенных бактерий, может помочь в выборе антибиотиков для целевого воздействия именно на данный возбудитель, не затрагивая нормальную микрофлору. Выявление новых метаболических путей может помочь созданию новых антибиотиков.

В результате таких исследований можно ожидать развитие новой медицины и ее новых подразделов, таких как генная терапия, фармакогеномика, лекарства нового поколения – эндогенные биорегуляторы, ДНК-вакцины. Будут развиваться новые методы диагностики предрасположенности к болезням, новые технологии экспресс-диагностики вновь появляющихся инфекций. Появятся новые технологии для развития производства пищевых продуктов, для КОНТроля и улучшения экологических ситуаций.

Интересные возможности ДНК-технологии дают для решения экологических проблем. Создаются растения, которые экстрагируют или разрушают поллютанты почвы. Так, симбиотическому азотфиксатору люцерны *Rhizobium.meliloti*, был встроен ряд генов осуществляющих разложение бензина, толуола, содержащихся в горючем. Глубокая корневая система люцерны позволяет очищать почву, загрязненную нефтепродуктами на глубину до 2–2,5 метров.

Универсальный характер современной биотехнологии проявляется в широком использовании методов клеточной и генной инженерии, которые основаны на развитии молекулярной генетики, что открывает большие возможности для генетической реконструкции живых организмов в желаемых для исследователей направлениях. Основная цель этих исследований – путем генетического реконструирования получить как можно большее разнообразие организмов, которые можно было бы использовать не только для производства качественно новых продуктов, но и для переработки различных органических и неорганических веществ.

Человечество с надеждой ожидает создание таких клеточных культур и биореакторов, с помощью которых можно будет производить ценные лекарственные препараты для устранения ряда наследственных, онкологических, сердечно-сосудистых и других заболеваний, очистки и улучшения экологического состояния окружающей среды. Особенно перспективной представляется возможность получения новых высокопродуктивных форм организмов с улучшенными показателями качества продукции. Темпы развития биотехнологии в настоящее время можно сравнить с впечатляющим прогрессом компьютерной техники более 20 лет назад.

11.2. Биоинформатика

Первые работы по компьютерному анализу последовательностей биополимеров появились еще в 60–70-х годах XX в., однако формирование вычислительной биологии как самостоятельной области началось в 1980-х годах после развития методов массового секвенирования ДНК. С точки зрения биолога-экспериментатора, можно грубо выделить пять направлений вычислительной биологии; непосредственная поддержка эксперимента (физическое картирование, создание контиг и т. п.), организация и поддержание банков данных, анализ структуры и функции ДНК и белков, эволюционные и филогенетические исследования, а также собственно статистический анализ нуклеотидных последовательностей.

Разумеется, границы между этими направлениями в значительной мере условны: результаты распознавания белок-кодирующих областей используются в экспериментах по идентификации генов, одним из основных методов предсказания функций белков является поиск сходных белков в базах данных, а для осуществления детального предсказания клеточной роли белка необходимо привлекать филогенетические соображения.

В 1982 г. возникли GenBank и EMBL – основные банки нуклеотидных последовательностей. Вскоре после этого были созданы программы быстрого поиска по банку – FASTA и затем BLAST. Пожалуй первой работой, в которой биологически важный результат в значительной мере связан именно с компьютерным анализом, была статья, где показано родство онкогена *v-sis* из саркомы обезьян и фактора роста тромбоцитов.

Позднее были разработаны методы анализа далеких сходств и выделения функциональных паттернов в белках. Оказалось, что даже при отсутствии близких гомологов, можно достаточно уверенно предсказывать функции белков. Эти методы с успехом применялись при анализе вирусных геномов, а затем и позиционно клонированных генов человека. Алгоритмы анализа функциональных сигналов в ДНК (промоторов, операторов, сайтов связывания рибосом) менее надежны, однако и они в ряде случаев были успешно применены, например, при анализе пуринового регулона у *Escherichia coli*.

Созданы алгоритмы предсказания вторичной структуры РНК. Алгоритмические аспекты этой проблемы были разрешены достаточно быстро, однако оказалось, что точность экспериментально определенных физических параметров не позволяет осуществлять надежные предсказания. В то же время, сравнительный подход, позволяющий построить общую структуру для группы родственных или выполняющих одну и ту же функцию РНК, дает существенно более точные результаты.

Другим важным достижением, связанным с рибосомальными РНК, стало построение эволюционного дерева прокариот и вытекающей из него естественной классификации бактерий, используемой в банках нуклеотидных последовательностей, в частности GenBank.

Статистическая информация (в виде предсказания GenScan), последовательности гомологичных белков и последовательности EST являются исходным материалом для предсказания генов в последовательностях ДНК человека программой ААТ. Алгоритмы, объединяющие анализ функциональных сигналов в нуклеотидных последовательностях и предсказание вторичной структуры РНК, используются для поиска генов тРНК и самосплайсирующихся интронов. Одновременный анализ белковых гомологий и функциональных сигналов позволил получить интересные сведения об эволюции систем репликации по механизму катящегося кольца. Опыт показывает, что надежное предсказание функции белка по аминокислотной последовательности возможно лишь при одновременном применении разнонаправленных программ структурного и функционального анализа.

Основное направление этих работ – приближение теоретических методов к биологической практике. Это приближение имеет несколько аспектов. Во-первых, вновь создаваемые алгоритмы все ближе имитируют работу биолога. В частности, был формализован интегративный подход к поиску родственных белков в банках данных, позволяющий работать со слабыми гомологиями и искать отдаленные члены белковых семейств. При этом все члены семейства, идентифицированные на очередном шаге, используются для создания очередного образа семейства, являющегося основой для следующего запроса к базе данных. Другим примером являются алгоритмы, формализующие сравнительный подход к предсказанию вторичной структуры регуляторных РНК. Во-вторых, создаваемые алгоритмы непосредственно приближаются к экспериментальной практике. Так, повышение избирательности методов распознавания белок-кодирующих областей (возможно, за счет уменьшения чувствительности) позволяет осуществлять предсказание специфичных гибридизационных зондов и затравок для ПЦР.

Разработаны модельные системы распознавания отдельных областей биополимеров при белок-белковых или белок-нуклеиновых взаимодействиях.

Наконец, развитие Интернета – электронной почты и затем WWW – сняло зависимость от модели компьютера и операционной системы и сделало программы универсальным рабочим инструментом.

В 1970 г. В. Фитч ввел представление об ортологах и паралогах, которое является центральным для такого рода анализа. Оно основано на следующем соображении: дивергенция генов может быть следствием видообразования либо дубликации. Соответственно гены, которые первоначально разошлись при видообразовании (т. е. в некотором смысле один и тот же ген в разных геномах), называются ортологами, а гены, первоначальное расхождение которых связано с дубликацией, — паралогами. Примером ортологов могут служить альфа-глобины человека, шимпанзе и крысы. Согласно первоначальному определению паралоги – это гены из одного генома (например, альфа- и бета-глобины человека), однако в настоящее время паралогами называют и гены из разных геномов, лишь бы в вершине эволюционного дерева этих генов была дубликация – например, альфа-глобин человека и бета-глобин шимпанзе.

Анализ ортологов дает возможность приписать функциональную роль 40–65 % генов. С этой целью используются отдаленные гомологии, анализ функциональных сигналов в белках, предсказание трансмембранных сегментов и сигнальных пептидов, а также структур вида coiled coil, неглобулярных сегментов и липопротеинов. В конечном счете этого оказывается достаточно для того, чтобы достаточно подробно реконструировать метаболизм бактерий. Полученные результаты накладываются на универсальные карты метаболических путей и тем самым выделяются ветви метаболизма, реализованные в рассматриваемом геноме.

К настоящему времени в области ДНК-технологий и биоинформатики создана хорошая стартовая площадка для успешного развития дальнейших исследований. Выяснены функции многих простых и сложных биомолекул; при этом главными достижениями являются установление информационной роли ДНК и расшифровка механизма

передачи информации от ДНК к белку. Выделены главные органеллы клеток животных и растений, установлены их основные функции. Получены в высокоочищенном виде многие ферменты, охарактеризованы механизмы регуляции их активности. Изучены формы запасаания и использования энергии. Достигнуты существенные успехи в изучении структуры и функции мембран. Выяснено действие главных гормонов. Установлены биохимические нарушения, лежащие в основе ряда заболеваний.

Вместе с тем остается еще немало проблем, требующих изучения. К их числу относится выяснение механизмов регуляции и координации процессов жизнедеятельности в онтогенезе; на начальных стадиях находятся, в частности, исследования по расшифровке механизмов регуляции экспрессии генов, с которыми связаны процессы роста и деления клеток, их дифференцировка, а при патологии – опухолевая трансформация. Потеря контроля пролиферации коррелирует со снижением способности клеток репрессировать трансляцию, ибо экспрессия большинства известных онкогенов и факторов роста находится под строгим трансляционным контролем. Протеинкиназы являются одним из тех мощных инструментов, с помощью которых клетка осуществляет регуляцию трансляции, модифицируя белковые факторы, особенно факторы трансляции. Поэтому понятно, что нарушение регуляции их экспрессии или функции чревато тяжелыми последствиями для клетки. Весьма ограничены сведения о структурно-функциональной организации хромосомы ядра, цитоплазмы, клеточного движения, механизмах клеточной секреции. Например, у разных видов бактерий обнаруживаются выраженные отличия в амплифицированности различных генов. Видимо, значительное увеличение копийности генов связано с особенностями внешней среды, экологией вида. Анализ паралогов является важным аспектом изучения бактериальных геномов, эволюции генов путем дупликации, которая обеспечивает видам адаптацию к меняющимся условиям окружающей среды.

Жизнедеятельность клетки включает разнообразие внутриклеточных и межклеточных взаимодействий, которые далеко не всегда могут быть выявлены на основании

информации о структурных свойствах молекул, существующих в клетке. Сюда вовлекаются взаимодействия между разными компонентами и процессами, такими как сборка многосубъединичных комплексов, их внутриклеточная компартментализация, организация цитоскелета, распределение и движение макромолекул между мембраной, ядром и цитоплазмой, организация и взаимодействия между внутриклеточными органеллами, системы транспорта между компартментами и множество других факторов, которые трудно поддаются учету.

Не совсем ясно, например, как клеточная архитектура влияет на транспорт белков от места их синтеза к мишеням их действия, как осуществляется координация активности и биогенеза органелл, как создаются внутриклеточные компартменты, как образуются транспортирующие везикулы, каким образом количество и компартментализация белков регулируется в процессах клеточного цикла и дифференцировки, как происходит регуляция движения хромосом в процессе митоза и мейоза, каким образом внеклеточные взаимодействия влияют на судьбу клетки с участием внеклеточного матрикса. Наконец, как обеспечивается передача сигналов от внешних и внутренних систем к аппарату транскрипции, как участвуют элементы клеточной архитектуры, например, цитоскелет, в транспорте белков (в частности, в обеспечении канализованности этого транспорта).

Остается неясной природа многих наследственных заболеваний. Не удастся пока сформулировать конструктивное представление о сложных биохимических процессах, свойствах индивидуальных молекул в клеточном контексте. Это включает в себя множественные взаимодействия молекул и систем в их пространственной и временной последовательности, их процессинг и модификацию, в том числе взаимодействие между различными клеточными популяциями многоклеточных организмов, функционирование центральной нервной системы. Другая проблема связана с образованием клеточных и ядерных компартментов, по которым рассортировываются продукты паралогичных генов. Эти компартменты могут контролироваться независимо и проявлять различные функциональные

свойства. В опухолевых клетках изменения генома приводят к изменению цитоскелета. Найдены мутации, меняющие цитоскелет. При дифференцировке клеток в процессе развития цитоскелет меняется и в разных типах клеток он различен.

Современный этап развития биотехнологий, основанный на широком использовании ДНК-технологий, представляет удивительное явление, когда разработка комплекса новых научных методологий дает мощный импульс в понимании структурно-функциональной организации живой материи и ее эволюционного развития. Бурному прогрессу ДНК-технологий способствовало то, что сразу была осознана огромная их важность и перспективность в решении многих проблем экологии, биологии, медицины, промышленности и сельского хозяйства. Кроме того, впервые исследователям предоставлена возможность не только изучать механизмы жизнедеятельности организмов, но и сознательно планировать изменения в них.

11.3. Протеомика

Программа «Геном» (современная геномика) дала возможность определить химическое строение генов и их расположение на хромосомах. Эта информация, в принципе достаточна для того, чтобы собрать искусственную хромосому и ввести ее в клетку и выяснить, как она работает.

Сейчас активно выполняется проект «Протеом», т. е. установление и расшифровка аминокислотных последовательностей и доменной организации всех белков, работающих в любом организме (в т. ч. и человека): обнаружение их, сопоставление с генетической картой генома и выявление всех функций. Это задача еще более сложная, чем та, которую удалось решить.

Протеомика – отнюдь не самая новая из наук. Вот уже несколько десятилетий человеческую протеому (набор белков в человеческом организме) углубленно изучают во многих исследовательских центрах мира, а крупные фармацевтические компании, такие как Bayer, Merck и другие, вкладывают в белковые исследования немалые деньги. Прочсть человеческую протеому так же важно, как и расшифровать

человеческий геном. Сегодня, даже с привлечением самых совершенных технологий и самых последних биомедицинских идей, на создание нового лекарства уходит 15–20 лет. Зная протеому, этот срок можно сократить до 2–3 лет.

Современные методы позволяют читать генетический текст (любую последовательность нуклеотидов в любом организме), эта последовательность четырех нуклеотидов, читается «буква за буквой». Предложен способ, который позволяет читать целыми словами и даже предложениями. Для этого создается так называемый «секвенирующий микрочип». Секвенирующие микрочипы произвели настоящий переворот в биологии.

Используя флюорисцентные метки различного цвета, сразу можно наблюдать разноцветную картинку. Вместо тысяч кропотливых лабораторных операций теперь надо провести буквально две-три и получить при этом тот же объем информации. Если существующий методы рассчитаны на расшифровку последовательности из 20 тыс. нуклеотидов в день, то секвенирующие микрочипы способны повысить производительность до миллиона нуклеотидов.

Важно подчеркнуть, что сопоставление секвенированных нуклеотидных последовательностей у разных видов часто позволяет получить неожиданную информацию об эволюционных событиях, о механизмах возникновения и поддержания генетической изменчивости. В качестве примера можно привести результаты межвидовых сравнений нуклеотидных последовательностей одного из экзонов гена каппа-казеина, особое внимание к которому обусловлено тем, что одна из мутаций в этом экзоне прямо связана с характеристиками молока у крупного рогатого скота и в развитых странах ее выявление включено в селекционные программы.

Огромный шаг вперед был сделан в последние несколько лет в исследовании и анализе белок-белковых взаимодействий, белкового состава органелл, характера экспрессии различных структурных генов, кодирующих белки у раковых больных. Термин протеомика был предложен в целях изучения всего множества белков, кодируемых геномом. Исследования в области протеомики затрагивают не только все белки в любой данной

клетке, но также и все варианты одного белка, его изоформ и изменений, взаимодействия между ними, структурное описание белков и их взаимоотношений в пределах одной клетки, между разными клетками в одной ткани, в пределах межтканевых взаимоотношений в целом многоклеточном организме, т. е. клеточных комплексов более высокого порядка, в которых реализуется практически весь геном. Протеомика основана на достижениях высокого уровня белковой биохимии. Высокая производительность соответствующих аналитических методов позволяет полагать, в конечном итоге они могут позволить полностью описать функции протеома – совокупности белков, кодируемых разными геномами. Протеомика, очевидно, дополняет геномику, для чего используют оценки экспрессии генов на уровне клетки, клеточных сообществ и целых многоклеточных организмов. Интеграция результатов исследований геномики и протеомики с использованием методов биоинформатики в конечном итоге приведет к формированию всесторонних баз данных о функциях генов, которые будут служить как фундаментальная информационная основа знаний о белковых характеристиках и их функциях, необходимых для системного биологического подхода в изучении организации и функции живых объектов.

Развитие протеомики не было бы возможным без предыдущих достижений в геномике, которые обеспечили понимание структурно-функциональной организации генов и путей реализации генетической информации в белковые продукты генов. Необходимо подчеркнуть различия между задачами протеомики и огромными, но менее сложными с биохимической точки зрения проблемами, первоначально стоящими перед геномными проектами. В отличие от масштабных исследований ДНК с использованием стандартных технологий типа полимеразной цепной реакции и автоматизированного последовательного выполнения операций, протеомика имеет дело с неизбежными проблемами ограниченного количества и изменчивостью исходного для исследований материала, разрушения образцов, быстрые изменения в количестве (на порядок), множеством посттрансляционных модификаций, специфич-

ностью появления и исчезновения белков в зависимости от ткани, стадии развития, патологии и влияния различных экзогенных факторов и лекарственных препаратов. Все эти трудности ограничивают развитие протеомики. В настоящее время можно выделить пять основных направлений исследований в области протеомики, связанные с развитием соответствующих технологий и их применением. К ним относятся протеомика, основанная на масс-спектрометрии, биохимический анализ протеомов разных геномов, анализ изображений и системная структурная биология, протеомная информатика и клинические приложения протеомики. Понятно, что границы между этими направлениями достаточно условны и не только потому, что методические достижения в одной области немедленно начинают использоваться в другой. Более важно то, что глубокое проникновение в особенности функции белка часто возникает благодаря комбинации разных подходов в протеомике, они дополняют друг друга.

Необходимо подчеркнуть, что в отношении даже простых модельных организмов, созданные карты белковых взаимодействий еще очень далеки от насыщения и совершенства. Как только плотность известных взаимодействий возрастет, появится возможность для формирования гипотез, которые в свою очередь будут увеличивать скорость насыщения таких карт, особенно в сочетании с другими геномными данными, включая структурные прогнозы. Когда накопится достаточное количество данных о динамике межбелковых взаимодействий, достаточных для построения моделей клеточного поведения, это позволит создавать модели для оценки последствий возникновения мутаций и приемы по разработке лекарств, адресованных к конкретным белкам и белковым участкам.

Моделирование сетевых взаимоотношений между белками является сложной задачей, которая усложняется еще больше необходимостью разработки специальных инструментов для их визуализации и возможности их объединять с другими генетическими базами данных. В этом направлении имеются огромные возможности для развития новых подходов, часть из которых уже разрабатываются в других областях, развитие которых также сдерживается информационной перегрузкой.

Это относится и к разработке сложных приемов для кластеризации данных по микромассивам ДНК (микрочипы) и их мультивариантных графических представлений, в которых используют цветные метки для выделения определенных кластеров и т. д.

В клинике всесторонний протеомный анализ малых количеств ткани больного может облегчить диагностику и подбор соответствующих методов лечения. Очевидно, что именно практическое использование данных протеомики в клинике особенно нуждается в автоматизации.

Согласно существующим представлениям, возможны три механизма консервативности таких характеристик. Первый механизм обусловлен инвариантностью функционально важных позиций белка. Это означает, что любые мутации в таких позициях белка приводят к нарушению его функции.

При анализе гомологичных белков аминокислотные замены в таких позициях белка не наблюдаются. Второй механизм обусловлен консервативными заменами аминокислот в позициях белка. Эти замены происходят таким образом, что физико-химические свойства остатка существенно не меняются (например, замена изолейцина на лейцин в гидрофобно ядре глобулы). Третий механизм подразумевает существование коадаптивных замен аминокислот в последовательности белка. Это замены в группах позиций белка, которые фиксируются зависимым образом (коадаптивно). В частности, эти замены могут иметь компенсаторную природу, обусловленную близостью остатков в белковой глобуле. Таким образом, консервативные характеристики белка, обусловленные последним механизмом, могут быть выявлены с помощью анализа коадаптивных замен аминокислот в последовательностях белкового семейства. В последнее время методы выявления и анализа таких замен интенсивно развиваются и позволяют получать важные данные о структуре и функции белка.

Представления о модульном строении генома, комплексах ко-эволюционирующих и коэкспрессирующихся генов, вовлеченных в общий биохимический процесс, позволяют по-новому осмысливать процессы, лежащие в основе изменчивости

и адаптивности. Быстрота адаптации естественно выше, если отбор признаков основывается не на изменениях в экспрессии отдельных генов (мутации), а на изменении целых модулей, контролирующих экспрессию целого ряда генов. Таким путем теоретически достигается большая генетическая пластичность, чем это предполагалось ранее. Кроме того, количество мутационных шагов, приводящих к адаптивному изменению для такой схемы, значительно меньше.

11.4. ДНК экология

Ряд экологических и агроэкологических проблем, в решении которых большие надежды возлагаются на ДНК-технологии, носит комплексный характер. К ним относится проблема повышения плодородия почв. Использование для этих целей удобрений, главным образом азотистых, не дает желаемого эффекта по двум причинам. Во-первых, химический синтез азотистых удобрений идет с помощью энергоемкого и дорогостоящего процесса. Во-вторых, для создания в почве нужной концентрации удобрений их вносят в избытке и они в значительном количестве вымываются, что приводит к загрязнению водоемов и к нежелательным экологическим сдвигам в окружающей среде. В связи с этим ДНК-технологиям предстоит разработать способы использования биологической системы фиксации азота для обеспечения солями аммония сельскохозяйственных культур. Возможны несколько вариантов решения этой задачи: применение свободно живущих бактерий, фиксируют азот, или изолированной модифицированной нитрогеназы (фермент, ведущий биологическую азотфиксацию) в промышленном производстве аммиака; повышение эффективности природных азотфиксирующих бактерий-симбионтов и разработка новых симбиотических ассоциаций; введение генов азотфиксации (*nif*-генов) в культурные растения и др. Конечно, предварительно нужно провести работу по выяснению механизмов симбиотических взаимоотношений, разработке способов защиты нитрогеназы от действия кислорода, по расшифровке систем регуляции нитрогеназ и т. п. В решении таких фундаментальных проблем тоже ожидается помощь от генетической инженерии.

12. ПРИКЛАДНЫЕ ДНК-ТЕХНОЛОГИИ. ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

12.1. Недостатки традиционной селекции и современные ДНК-технологии в их преодолении

Широко известны медицинские проблемы, связанные с действием возбудителей болезней растений, в частности, грибов на организм человека. Так, продукты жизнедеятельности грибов аспергил – афлатоксины являются опасными канцерогенами. Сегодня этим неистребимым грибом заражены посевы зерновых по всему миру – 20–25 % площадей в зависимости от культуры и региона. И эти афлатоксины мы, не ведая об этом, потребляем, например, с хлебом. Генетически модифицированные – ГМ-сорта с устойчивостью к грибным заболеваниям не несут никаких токсических нагрузок. Некоторые исследователи считают, что проблемы заболеваний, которым положены растения, на порядок выше той, что связана с ГМ.

Учитывая возрастающий интерес фермеров и других производившей к биотехнологической продукции, увеличение посевных площадей под ГМ-культурами, в рамках государственных инициатив предусмотрено углубление научных исследований по оценке риска технологической продукции. Ученые, как правило, высказывали за принцип «осторожного отношения». Восприятие риска, оценка риска несомненно зависят от уровня культуры нации. Например, даже «зеленые», активно протестуя против использования ГМ-растений в сельском хозяйстве, как правило, даже не упоминают об использовании ГМ в медицине и фармакологии. Те же «Друзья Земли» признают безопасность устойчивых к гербицидам растений. Никому не приходит в голову протестовать против генно-инженерного (человеческого) инсулина, которому диабетики в своей массе отдают предпочтение перед отечественным «свиным».

Во многих странах мира уже широко применяются в растениеводстве так называемые трансгенные (точнее другой термин – модифицированные) растения – соя, кукуруза, хлопок,

рапс, картофель и многие другие, устойчивые к определенным пестицидам или насекомым. В 1995 г. в США зарегистрирован модифицированный сорт картофеля «кленовый лист», устойчивый к колорадскому жуку (компания «Монсанто»). Уже в последующие два года модифицированный сорт картофеля зарегистрировали у себя Канада, Япония, Мексика. Многие страны Европы, Южной Америки, Австралия проводят сегодня испытания модифицированных сортов растений. Недавно в центре «Биоинженерия» РАН зарегистрирован устойчивый к колорадскому жуку сорт картофеля.

Позитивные стороны модификации растений очевидны. Это – упрощение технологий выращивания сельскохозяйственных культур, существенное снижение энергозатрат. А, главное – уменьшение загрязнения окружающей среды пестицидами. Кроме того ГМ-растения дают значительное повышение урожайности за счет снижения вредных воздействий насекомых и микроорганизмов, происходит снижение себестоимости, а отсюда и цен на продукты питания.

Надежды, которые возлагаются на генетически модифицированные (ГМ) растения, можно подразделить на два основных направления:

1. Усовершенствование качественных характеристик продукции растениеводства;
2. Увеличение продуктивности и стабильности растениеводства путем повышения резистентности растений к неблагоприятным факторам.

Создание генетически модифицированных растений чаще всего выполняется для решения следующих конкретных задач:

1. В целях увеличения урожайности путем повышения:
 - а) резистентности к патогенам;
 - б) резистентности к гербицидам;
 - в) устойчивости к неблагоприятным температурам, невысокому качеству почв;
 - г) улучшения характеристик продуктивности (вкусовых и питательных качеств, оптимальный метаболизм).
2. В фармакологических целях :
 - а) получение продуцентов терапевтических агентов;

б) продуцентов антигенов, обеспечения пищевой «пассивной» иммунизации.

Основные задачи ДНК-технологии в создании ГМ-растений в современных условиях развития сельского хозяйства и общества довольно многообразны и заключаются в следующем:

1. Получение гибридов (совместимость, мужская стерильность);
2. Оптимизация роста и развития растений (изменение габитуса растений – например, высоты, формы листьев и корневой системы и др.; изменение в цветении – например, строении и окраске цветков, времени зацветания);
3. Оптимизация питания растений (фиксация атмосферного азота небобовыми растениями; улучшение поглощения элементов минерального питания; повышение эффективности фотосинтеза);
4. Улучшения качества продукции (изменение состава и/или количества сахаров и крахмала; изменение состава и/или количества жиров; изменение вкуса и запаха пищевых продуктов; получение новых видов лекарственного сырья; изменение свойств волокна для текстильного сырья; изменение качества и сроков созревания или хранения плодов);
5. Повышение устойчивости к абиотическим факторам стресса (устойчивость к засухе и засолению, жароустойчивость; устойчивость к затоплению; адаптация к холоду; устойчивость к гербицидам; устойчивость к кислотности почв и алюминию; устойчивость к тяжелым металлам);
6. Увеличение устойчивости к биотическим факторам стресса (устойчивость к вредителям; устойчивость к бактериальным, вирусным и грибным болезням).

На практике ситуация выглядит следующим образом: среди промышленно выращиваемых трансгенных растений доля устойчивых к гербицидам составляет 71 %, устойчивых к вредителям – 22 %, устойчивых одновременно к гербицидам и вредителям – 7 %, устойчивых к вирусным, бактериальным и грибным болезням – менее 1 %.

Среди главных признаков, контролируемых перенесенными генами, на первом месте стоит устойчивость к гербицидам.

Среди генов, определяющих устойчивость к гербицидам, уже клонированы гены устойчивости к таким гербицидам как глифосат (Раундап), фосфинотрицин (Биалафос), глифосинат аммония (Баста), сульфонилмочевинные и ийидозолиновые препараты. С использованием этих генов уже получены трансгенные соя, кукуруза, хлопчатник и т. д. В России также проходят испытания трансгенные культуры, устойчивые к гербицидам. В Центре «Биоинженерия» создан сорт картофеля, устойчивый к Басте, проходящий в настоящее время полевые испытания. Необходимость создания ГМ в современном мире связана с тем, что многие сорта характеризуются недостаточной приспособленностью к местным особенностям почвенно-климатических и погодных условий, технологиям возделывания (сортовой агротехнике) и требованиям рынка, нарушениям принципов агроэкологического макро-, мезо- и микрорайонирования сельскохозяйственной территории. Односторонняя ориентация на «техногенную» интенсивность сортов и гибридов, способных обеспечить рост урожайности лишь при всевозрастающих затратах исчерпаемых ресурсов (минеральных удобрений, мелиорантов, пестицидов, орошений и пр.) неизбежно приводит к снижению коэффициентов ресурсной и энергетической эффективности, непропорциональному росту затрат невозполнимых ресурсов, загрязнению и разрушению природной среды.

Существенным направлением в получении ГМ-растений являются попытки создать **биотопливо**. Проблема создания биотоплива возникла достаточно давно. Об этом мечтал еще Генри Форд. Будущий бензин можно будет извлекать из генетически модифицированных сои или кукурузы, т. е. будут растения-фабрики по производству заданных веществ (например, упомянутого растительного масла, которое в недалеком будущем с успехом заменит нефть в качестве топлива). В результате резко сократится воздействие добываемого топлива на окружающую среду. Переход к топливным плантациям должен начаться с биодизельных топлив – их молекулярная структура настолько близка к структуре некоторых растительных масел, что на первых порах можно

будет обойтись и без генной инженерии.

Необходимо подчеркнуть, что с помощью генетической инженерии новые сорта не создают, а только изменяют их, делают более адаптированными к конкретным условиям разведения и задачам, т. е. исходный сорт должен быть уже адаптирован к определенным условиям внешней среды, а также технологиям возделывания. Поэтому, в комплексных селекционно-агротехнических программах должны быть изначально определены цели и этапы использования классических и биоинженерных методов управления наследственной изменчивостью при реализации той или иной морфофизиологической модели сорта (гибрида). Обычно районированные сорта, используемые для генно-инженерной работы, характеризуются идеальной агроэкологической «подогнанностью» его генома и цитоплазмы (плазмона), к конкретным условиям.

В принципе, трансгенные растения должны заметно увеличить разнообразие сельскохозяйственных культур. Например, до сих пор селекция кукурузы в США основана на небольшом числе культивируемых сортов, и в результате применяемый генофонд довольно беден. Семена сортов, находящихся в семенных банках, практически не используются. Для скрещивания применяют несколько высокоурожайных сортов. А если у нас есть гены, ответственные за необходимые свойства, вводя их в эти сорта, мы увеличим биоразнообразие используемых сортов.

Генетической инженерией занимается и сама природа. За тысячелетия с помощью естественного отбора она добилась немало. Так, в частности, полагают, что вследствие генных мутаций и природной генной инженерии она поставила на стол человеку массу новых продуктов, начиная от мягкой пшеницы (слияние трех геномов) и кончая кукурузой. Но как селекционеру спрессовать миллионы лет того, что делала природа в годы и даже месяцы? Как максимально сократить сроки? Способна ли справиться со всем этим генетика и селекция? Адаптивная система селекции растений, базирующаяся на мобилизации генофонда, управлении наследственностью,

сортотипировании и семеноводстве, обеспечивает повышение величины и качества урожая сельскохозяйственных культур на большей части земледельческой территории Земли. При этом именно селекционеры растений выполняют роль стратегов в улучшении сельскохозяйственных культур и обеспечении продовольственной безопасности, осваивая новые, в т. ч. и трансгенные, технологии. Поэтому ближайшая проблема в области селекции состоит в том, чтобы интегрировать и скоординировать усилия селекционеров и молекулярных биологов для решения общей задачи – повышения выхода и качества урожая, ресурсо-энергоэкономичности, экологической надежности, безопасности и рентабельности растениеводства.

12.2. Скорость распространения ГМО

Не смотря на широкие дискуссии по поводу опасности использования генетически модифицированных (ГМ) сортов растений, в развивающихся странах площади, занятые ГМ выросли в 2000 г. на 51 %, от 7,1 млн. га в 1999 г. до 10,7 млн. га, что сопровождалось только 2 % роста в индустриальных странах, от 32,8 млн. га в 1999 г. до 33,5 млн. га в 2000 г.

Темпы распространения ГМ растений хорошо иллюстрируются следующими данными, полученными в 2004 г. (www.fao.org).

По данным на 2005 г., общая площадь генетически модифицированных культурных растений (ГМ культур) продолжает расти и составляет более 100 млн. га в 2005 г. В Испании в 2004 г. площадь ГМ культур увеличилась на 80 %. Согласно ежегодному отчету, составленному доктором Клайвом Джеймсом (Dr. Clive James), председателем совета директоров ISAAA, основными данными по применению ГМ в мире являются следующие. В 2004 г. общая площадь ГМ культур составила 81 млн. га. По сравнению с 2003 г., это увеличение на 20 % или 13,3 млн. га. Впервые прирост в развивающихся странах (7,2 млн. га) был больше, чем в промышленно развитых странах (6,1 млн. га). В 2004 г. ГМО выращивали 8,25 млн. фермеров в 17 странах (на 1,25 млн. человек больше, чем в 2003 г.). 90 % – это

фермеры развивающихся стран. В 14 странах площади ГМО составляют > 50 000 га. В 2003 г. таких стран было 10, прибавились Парагвай, Мексика, Испания и Филиппины. Они добавились к таким странам, как США, Аргентина, Канада, Бразилия, Китай, Парагвай, Индия, ЮАР, Мексика, Испания, Филиппины, Уругвай, Австралия, Румыния. Больше всего выращивается ГМО в следующих странах.

Таблица 1
Скорость роста площадей в мире, занятых генетически
модифицированными растениями

Год	млн. га
1996	1,7
1997	11,0
1998	27,8
1999	39,9
2000	44,2
2001	52,6
2002	58,7
2003	67,8
2004	81,0

Таблица 2
Страны-лидеры в выращивании генетически
модифицированных растений

Страна	% от общей площади ГМО в мире
США	59 %
Аргентина	20 %
Канада	6 %
Бразилия	6 %
Китай	5 %
Парагвай	2 %
Индия	1 %
ЮАР	1 %

Испания – единственная Европейская страна, которая имеет 58 000 га Вt кукурузы. По сравнению с 2003 г., это увеличение на 80 %;

Германия – небольшая площадь Вt кукурузы;

Румыния – 100 000 га ГМ сои.

5 развивающихся стран – Китай, Индия, Аргентина, Бразилия, ЮАР – оказывают большое влияние на другие регионы.

Таблица 3
Прирост площадей, занятых ГМ растениями в разных странах
за 2004 г.

СТРАНА	Площадь гм культур, млн. га	% от показателя 2003 г.	% от общей площади ГМО в мире	ПРИМЕЧАНИЯ
США	47,6	+11 %	59 %	Кукуруза, соя, хлопчатник
Аргентина	16,2	+17 %	20 %	Кукуруза, соя ГМ соя – 100 %
Канада	5,4	+23 %	6 %	Кукуруза, соя, рапс ГМ рапс – 71 %
Бразилия	5	+66 %	6 %	Соя 2-й год выращивания
Китай	3,7	+32 %	5 %	Хлопчатник ГМ хлопчатник – 66 %
Парагвай	1,2		2 %	Соя 1-й год выращивания
Индия	500 000 га		1 %	
ЮАР	~ 500 000 га	+25 %	1 %	Кукуруза, соя, хлопчатник ГМ соя = 50 % ГМ хлопчатник – 85 %
Уругвай	300 000 га	+200 %		Кукуруза, соя ГМ соя – 100%
Австралия	250 000 га	+100 %		Хлопчатник

Продолжение таблицы 3

Румыния	100 000 га			Соя
Мексика	75 000 га			
Испания	58 000 га	+80 %		3т кукуруза
Филиппины	52 000 га	в 2003 г. было 20 000 га		3т кукуруза
Колумбия	10 000 га			3т хлопчатник
Гондурас	Мало			
Германия	Мало			Вт кукуруза

В 2004 г. наблюдалось следующее распределение ГМ растений.

По признаку:

1. Гербицид-устойчивые ГМ – 58,6 млн. га (72 %);
2. Вт культуры – 15,6 млн. га (19 %);
3. устойчивые к гербициду + вредителям – 6,8 млн. га (9 %).

Преобладающими ГМ культурами были соя – 48,4 млн. га (60 % ГМО), в 9-ти странах и Вт кукуруза 11,2 млн. га (14 % всех ГМО). 2004 г. 5 % всей площади сельскохозяйственных культур в мире •5 млрд. га) было занято ГМ растениями. В период 1996–2004 гг. доминируют устойчивые к гербицидам ГМ.

Из этой сводки становится очевидным стремительность распространения ГМ растений по всему миру.

12.3. Основные причины распространения ГМ сортов

Причины высокой скорости распространения ГМ растений очевидны из фактов, приведенных в докладе Национального центра пищевой и сельскохозяйственной политики США (The National Center on Food and Agricultural Policy (NCFAP), в котором подчеркивается, что использование ГМ растений является существенной частью современной стратегии фермеров, благодаря которой возможно увеличение урожая и уменьшение его себестоимости. Sujatha Sankula, директор

биотехнологических исследований в NCFAR, в своем докладе отметил: «По сравнению с 2001 г., в 2004 г. произошло увеличение урожайности на 41 %. Стоимость продукции уменьшилась на 25 %, увеличение прибыли составило 27 %. Использование пестицидов уменьшилось на 2 %». В 2004 г. прибыль от ГМ составила 1900 млн. долларов, прирост урожая – 5300 млн. фунтов, уменьшение использования пестицидов – 46,4 млн. тонн. Это наблюдалось у фермеров всех 42-х штатов, где применяли ГМ сорта. Наибольшая прибыль, в мерах увеличения конечной продукции и уменьшения использования пестицидов, была в Айове, затем в Иллинойсе и Миннесоте. Согласно Sankula, особую часть прибыли составляет уменьшение негативного влияния на окружающую среду при использовании ГМ, что связано с уменьшением использования пестицидов, уменьшения эрозии почв, затрат воды, уменьшением использования сельскохозяйственной техники. Sankula констатирует факт, что современные биотехнологии увеличивают общую эффективность использования хлопка на 300 %, сои – на 45 % и кукурузы – на 14 %. В своем докладе Sankula подчеркивает, что «Увеличение использованием ГМ, увеличивает прибыль. Коммерческие преимущества для фермеров при использовании ГМ сортов являются ключевым фактором для их распространения».

Исследователь Института Hoover, Mr. Henry Miller, утверждает, что генетически модифицированные растения являются практикой, которая будет использоваться веками. В своей рецензии на книгу с остроумным названием «Мендель в кухне» (Mendel in the Kitchen, авторы Nina Federoff и Nancy Marie Brown), он отмечает, что все зерновые, фрукты и овощи, из которых складывается наша еда, за исключением дикой вишни и грибов, являются генетически модифицированными по отношению к своему «естественному», исходному состоянию. Картофель, томаты, овес, рис и кукуруза, например, происходят от растений, созданных в последние полвека при очень широкой перекрестной гибридизации между сортами, которая превышает естественные границы такой гибридизации. В этом смысле вся сельскохозяйственная практика последних 10 тысяч лет была –

неестественной. Генетические модификации путем разрезания и встройки генов это только последняя, очень небольшая глава в веках последовательного генетического улучшения сельскохозяйственных видов растений. И это – только усиление предсуществовавших технологий. Н. Miller критикует истерию вокруг ГМ сортов, в которой больше эмоций и страхов и почти совсем нет фактов. Он полагает, что и главный источник такой истерии обусловлен ошибочными представлениями о том, что переносимые гены не регулируются нормальным путем, не поддаются тестированию и являются вредными. Он указывает на то, что такие представления не соответствуют реальности, и книга «Мендель в кухне» подробно излагает долгий путь решения этих проблем. Он полагает, что распространение ГМ уменьшит использование пестицидов, увеличит устойчивость растений к вирусным инфекциям, к засухе и избытку воды.

В обнародованном 23 июня 2005 г. отчете «Современная пищевая биотехнология, здоровье и развитие: доказательное исследование» (Modern food biotechnology, human health and development: an evidence-based study) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ или World Health Organization – WHO) рассмотрены потенциальные выгоды и риски, связанные с применением ГМ в производстве (Продовольствия подчеркивается, что сложившаяся практика тщательной оценки безопасности ГМ-организмов (ГМО) перед выдачей разрешений на их выращивание и продажу позволяет исключить риски для здоровья человека и состояния окружающей среды).

Выгоды же очевидны: применение ГМ ведет к росту урожайности, уменьшению потерь продукции, повышает эффективность производства, улучшает качество и разнообразие пищевых продуктов, что, в свою очередь, способствует улучшению здоровья потребителей и росту их жизненного уровня. Кроме того эксперты прогнозируют и ряд важных «сопутствующих эффектов», например, сокращение использования удобрений и рост благосостояния фермеров, особенно в развивающихся странах. В то же время, раз некоторые гены, используемые при создании сортов, ранее отсутствовали в сельскохозяйственных растениях, эксперты

рекомендуют продолжать контроль потенциальных Сияний ГМ-продуктов на здоровье человека. Такой контроль долей вестись даже после их вывода на рынок, дабы своевременно выявить любые возможные неблагоприятные эффекты.

В пресс-релизе WHO, выпущенном по случаю выхода отчета отмечено, что, поскольку оценки риска для здоровья и воздействия на окружающую среду обязательны для всех ГМ-растений, разрешенных к применению, ГМ-продукты исследованы полнее, чем обычные. И до сих пор не известно ни одного случая, когда потребление ГМ-пищи вызвало бы какой-нибудь отрицательный эффект.

До сих пор, несмотря на широкое использование ГМ растений в США, ещё нет ни одного иска, представленного в судебные органы, по поводу нанесения ущерба здоровью человека или животному вследствие потребления ГМО.

В будущем эксперты рекомендуют расширить критерии оценки ГМ-пищи, включив в них социальные, культурные и этические аспекты. Пока такие оценки сосредоточены, прежде всего, на агрономических показателях и возможном влиянии на здоровье потребителей. Потребность в более широких взглядах на проблему, по мнению экспертов международных организаций, вызвана, в частности, тем, что в 2002 г. ряд африканских государств создали скандальный прецедент, отказавшись от гуманитарной помощи развитых стран из-за того, что в поставляемом продовольствии якобы могла оказаться ГМ-продукция. В результате такого отказа большое количество жителей этих стран умерло от голода.

«Пищевые продукты из ГМ-источников необходимо исследовать с разных точек зрения, включая социальный и этический аспекты, в дополнение к их возможному влиянию на здоровье и состояние окружающей среды. Если мы поможем государствам – членам ВОЗ сделать это на национальном уровне, мы сможем избежать возникновения «генетических барьеров» между странами, которые разрешают и не разрешают ГМ культуры», считает доктор Йорген Шлундт, директор Департамента безопасности продовольствия ВОЗ.

Все эти факторы влияют на отношение общества к ГМ-пище. В той или иной мере они учтены в 15 международных юридически закрепленных соглашениях и сводах правил, регламентирующих разные аспекты применения ГМО (впрочем, имеющих характер рекомендаций, совершенно необязательных к исполнению).

Для обсуждения значения и опасностей использования генетически модифицированных культурных растений в сельском хозяйстве, необходимо точно представлять себе, что реально опаснее – генетически модифицированные организмы, или современные приемы использования химических веществ (пестицидов) для защиты от болезней и вредителей.

Как известно, термин «пестициды» состоит из латинских слов – *pestis* (зараза) и *caedo* (убиваю). Их производство стало выгодным бизнесом для агропромышленных корпораций. В 1998 г. продажа пестицидов увеличилась на 5 % и достигла 31 млрд. долл. Лидером их поставок на мировой рынок была компания «Новартис» (Швейцария), которая довела объем продаж химикатов до 4 млрд. долларов. Главные экспортеры пестицидов сегодня – Франция, Германия, США, Великобритания и Швейцария получают весомую часть своих прибылей за счет торговли пестицидами.

Дорогостоящие рекламные кампании, замалчивание успехов биологических методов защиты растений, вообще весь арсенал современных методов обработки общественного мнения используется мощными химическими концернами для удержания позиций на рынке пестицидов. Вместе с тем анализ результатов многолетнего применения богатейшего арсенала пестицидов говорит о том, что попытки решить проблему повышения продуктивности сельского хозяйства за счет химизации практически исчерпаны и накопление пестицидов в почвах, продуктах сельского хозяйства, в организмах домашних и диких животных и человека уже привело к ряду неприятных последствий. Одно из них – уже упоминавшееся повышение устойчивости насекомых (объектов применения инсектицидов) к применяемым ядам, что ведет к увеличению доз при обработке полей и введению все более токсичных ядохимикатов. Это уже

привело к тому, что сельское хозяйство стало одним из наиболее опасных для здоровья видов деятельности. Так, по числу Утагенов (а именно пестициды являются основными мутагенами сельском хозяйстве) оно занимает второе место после отходов промышленности, опережая по этому показателю бытовую химию, медицину, транспорт, и «поставляет» людям 21 % всех химических мутагенов. Мутагенное и канцерогенное действие пестицидов – не единственная опасность для здоровья людей. Специальными исследованиями показано, что пестициды вызывают многочисленные нарушения деятельности нервной системы, органов чувств, системы пищеварения, генеративных функций. Расчеты показывают, что в США, где были особенно популярны пестициды, от 10 до 18 % смертей могут быть связаны с действием пестицидов. Анализ эффективности пестицидов и прогноз результатов перехода к биологическим методам защиты растений позволяют рассчитывать на постепенное избавление от опасного насыщения пестицидами экосистем, включая агросистемы.

Поскольку все применяемые на практике способы обработки пестицидами сельскохозяйственных культур связаны с распылением соответствующих растворов или порошков в воздухе, не оседающая на поверхность часть препарата образует более или менее устойчивые аэрозоли, которые разносятся даже слабым ветром на значительные расстояния. Дополнительное, хотя и не такое большое количество пестицидов, в частности инсектицидов, добавляют в воздушную среду обработки очагов трансмиссивных заболеваний против кровососущих насекомых – переносчиков. Воздушная среда находится в контакте и непрерывном взаимодействии с водами, почвами, растительностью. Это приводит к распространению пестицидов практически во всех средах на Земле, и хотя их концентрация максимальна в зонах непосредственного применения, на нашей планете уже нет места, абсолютно свободного от присутствия хотя бы следовых количеств этих ядов.

Многие загрязнители обладают одновременно канцерогенным (вызывающим раковые заболевания) и мутагенным (вызывающим повышение частоты мутаций,

включая нарушения, ведущие к уродствам) свойствами, поскольку механизм их действия связан с нарушениями структуры ДНК или клеточных механизмов реализации генетической информации. Такими свойствами обладают как радиоактивные загрязнения, так и многие химические вещества органической природы – продукты неполного сгорания топлива, ядохимикаты, применяемые для защиты растений в сельском хозяйстве, многие промежуточные продукты органического синтеза, частично теряемые в производственных процессах.

Опосредованное влияние, т. е. воздействие через почву, растительность и воду, связано с тем, что те же вещества попадают в организм животных и человека не только через дыхательные пути, но и с пищей и водой. При этом область их воздействия может существенно расширяться. Например, ядохимикаты, сохранившиеся в овощах и фруктах в опасных количествах, воздействуют не только на население сельских районов, но и на жителей городов, питающихся этой продукцией.

Опасность бесконтрольного применения пестицидов возрастает еще и от того, что продукты их метаболизма в почве иногда оказываются более токсичными, чем сами использованные на полях препараты.

Несмотря на «зеленую революцию» развивающиеся страны в ходе ее проведения не смогли создать самодостаточные аграрные экономики. Сельскохозяйственные реформы под эгидой МВФ сделали страны третьего мира заложниками глобального продовольственного рынка, на котором всего 10 корпораций контролируют все аспекты сельскохозяйственного производства в мире. На долю четырех из них приходится 90 % мирового экспорта кукурузы, пшеницы, табака, чая и ананасов. По прогнозам МВТ, многие страны Азии и Африки вынуждены будут почти удвоить импорт зерновых до 2020 г. Поэтому можно ожидать, что создание генетически модифицированных растений могло бы способствовать решению таких вопросов, как повышение урожая без дополнительного ущерба для экологии. Однако не все страны готовы довериться западным технологиям. Индия и Китай, например, проводят свои собственные исследования и оценки. Только в Китае, по некоторым оценкам, созданы более 50 тысяч

генных конструкций.

Широкое использование минеральных удобрений способствовало повышению урожайности зерновых, но вызвало нарушение глобального азотного баланса. Дальнейшее наращивание использования пестицидов создает огромную угрозу здоровью миллионов потребителей и хлеборобов. По оценке ВОЗ, ежегодно 3 млн. человек отравляются пестицидами и более 200 тыс. умирают при этом до 25 млн. сельскохозяйственных рабочих подвергаются воздействию химических веществ с риском для жизни.

Первым вопросом при оценке потенциальной опасности генетически модифицированных организмов (ГМО) является биологический смысл представлений о том, что такое генетически модифицированные организмы и в чем может быть их опасность.

Противники использования генетически модифицированных организмов подчеркивают следующее:

отмечается, что все высшие организмы без исключения содержат генетический материал, полученный ими благодаря горизонтальному переносу, т. е. от чужеродных для них организмов. Таким образом, проблема генетически модифицированных организмов заключается в том, что они содержат экзотический для себя генетический материал, который, кроме этого, может служить вектором переноса такой экзотической ДНК к другим представителям того же вида.

Например, известно, что агробактерии действительно распространяются по представителям различных таксонов растений и могут встраивать свои собственные гены в геномы хозяев, однако в естественных условиях они не переносят экзотические гены третьих видов. Потом, генетическая структура генетически модифицированных организмов характеризуется повышенной нестабильностью, поскольку, естественно, легкая встройка чужеродного материала не исключает ни инсерционного мутагенеза, ни легкого выщепления свежевстроенного материала. В принципе, сама встройка, поскольку количество копий и место интеграции контролировать достаточно трудно, может активировать различные мобильные

элементы генома самого хозяина, менять экспрессию различных его генов. Кроме того, встройка новых генов может создавать качественно новые меченые взаимодействия, часть которых может неожиданным, непрогнозируемым образом реализоваться в фенотипе, приспособленности и плодовитости генетически модифицированных организмов.

Таким образом, можно выделить пять основных направлений в эпасаениях при использовании ГМО для окружающей среды:

1. горизонтальный генный поток, благодаря чему будут генетически модифицированы все представители сельскохозяйственного вида, в т. ч. и представители предковых естественных рас в центрах происхождения domesticiрованных видов растений, и, таким образом, исходный предковый генофонд будет исчезать;

2. появление новых, незапланированных генных конструкций, новых вирусов, суперсорняков и супервекторов для переноса новых генетических элементов благодаря тому, что фактически невозможно спланировать те рекомбинационные процессы, в которые вступает генная конструкция, попавшая в геном хозяина;

3. индукция геномной нестабильности в геномах-мишенях генетической модификации, что может в последствии привести к сужению биоразнообразия;

4. изменение бактериальной компоненты человека в сторону повышения ее устойчивости к антибиотикам, поскольку генные конструкции часто несут гены устойчивости к антибиотикам;

5. недостаточно исследованными остаются аллергенные свойства экзотических белков, попадающих в пищу для человека и для иммунной системы человечества вообще.

Перечисленные возможные опасности реально существуют и нуждаются в специальных исследованиях, которые и проводятся в отдельных научных подразделениях, в основном, Канады, Англии и Америки.

Защитники генетически модифицированных организмов акцентируют свое внимание на следующих позициях.

Они полагают, что к генетически модифицированным организмам подходят на основании «двойного стандарта».

1. Влияние наличия аллергенных эффектов экзотических белков генных конструкций на иммунную систему человечества, также как и появление устойчивости бактериальной компоненты человека антибиотикам нельзя рассматривать отдельно, как самостоятельную проблему, а только по сравнению с такими же эффектами тех химических веществ, инсектицидов, пестицидов, гербицидов, которые ни замещают, т. е. пищевую опасность эндотоксина *Bacillus kuringiensis* (Bt), наиболее распространенного элемента генных конструкций в защите трансгенных растений от насекомых, нужно сравнивать с пищевой опасностью того же эндотоксина, который попадает в пищу при его использовании в качестве химического средства защиты растений, с учетом объемов его внесения в целые агросистемы. Это, в общем, никогда не рассматривается противниками ГМО, хотя сам метод получения ГМО вырос из объективной необходимости снижения химизации сельского хозяйства и медицины, достигшей очевидно катастрофических размеров в сравнении с возможностью экологических систем от нее освободиться.

2. Наличие либо отсутствие генетического потока, связанного с ГМО, вероятно появления суперсорняков, новых вирусов не может являться предметом общих рассуждений, а должно подкрепляться прямыми экспериментальными данными, которые к настоящему времени, несмотря на выполненные специальные исследования, отсутствуют в виде строго доказанных экспериментальных результатов. Кроме того, генный поток, если он выявлен, может быть исключен путем создания стерильных ГМО и специально разработанных методов гибели растений после определенной стадии развития. Если оказывается, что данная форма ГМО действительно несет высокий риск генного потока по каким-то другим причинам – ее просто нужно исключать из воспроизводства. То есть защитники ГМ полагают, что вопросы использования ГМ и их возможные опасности должны перестать представлять собой абстрактную дискуссию, нужно перейти к выбору конкретной стратегии использования ГМ со специальными приемами для предупреждения их нежелательных эффектов, специально

разработанными не на все случаи жизни, а конкретно, для каждого ГМ и сорта отдельно.

В то же время, сами агросистемы, их химизация, приводят к глубоким экологическим изменениям и способствуют появлению как новых суперсорняков, так и экспансии новых вирусов, дестабилизации генофондов сельскохозяйственных и диких видов. И только глубокие исследования глобальных изменений биосферы, связанных с деятельностью человека в XIX–XXI вв. и обусловленных техногенной революцией, могут служить тем контролем, по отношению к которому нужно оценивать возможную угрозу ГМО для биоразнообразия планеты.

Вопросы для самоконтроля:

1. Преимущества метаболомики.
2. Каковы достижения биоинформатики?
3. Сущность ДНК-экологии.
4. Каковы позитивные стороны модификации растений?
5. Назовите основные задачи ДНК-технологии в создании ГМ-растений.
6. Получение ГМО и создание биотоплива.
7. Кратко охарактеризуйте распространение ГМО.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные ДНК-технологии объединяют химию нуклеиновых кислот и белков, микробиологию, генетику, биохимию и открывают новые пути решения многих проблем биотехнологии, медицины и сельского хозяйства.

Основная цель и задачи ДНК-технологий направлены на разработку методов и приемов, позволяющих получать биологически активные соединения (ферменты, гормоны), а также конструировать молекулы новых веществ и создавать новые формы организмов, отсутствующие в природе (химерные молекулы, трансгенные животные).

Использование достижений ДНК-технологий идет в основном в следующих направлениях:

- исследование наследственности на генном, геномном и популяционном уровнях;
- конструирование новых организмов путем пересадки чужеродных генов, т. е. получение трансгенных животных.

В связи с очевидной практической значимостью этого направления на Западе образован целый ряд коммерческих фирм, задачей которых является использование методов ДНК-технологий для создания новых форм животных и растений, несущих полезные признаки. Многомиллиардные финансовые вливания этим фирмам привели, уже в настоящее время, к революционным изменениям в целом ряде традиционных теоретических и прикладных направлениях биологии, медицины и сельского хозяйства. По-видимому, в современной биологии, во всем диапазоне ее областей – от физиологии клетки до механизмов высшей нервной деятельности, не осталось ни одной, в которой бы не нашли своего применения ДНК-технологии.

Фактически созданы предпосылки для качественных перемен не только в прикладной биологии и сельском хозяйстве, но и в жизни человечества. Разработка ДНК технологий во многом определила справедливость прогноза о том, что в XXI столетии решающую роль в развитии и существовании мирового сообщества будет играть биология. Ее

достижения, наряду с биоинформатикой, позволят вплотную подойти к формированию ноосферы, обеспечивающей удовлетворение возрастающих потребностей человечества при сохранении окружающей среды.

Современные экспериментальные методы позволяют анализировать и идентифицировать фрагменты ДНК и генетически видоизмененной клетки, в которую введена нужная ДНК. С их помощью целенаправленно осуществляются химические операции над биологическими объектами, что и составляет основу ДНК-технологий. Генные технологии привели к разработке мощных методов анализа генов геномов, а они, в свою очередь, – к синтезу, т. е. к конструированию новых, генетически модифицированных микроорганизмов.

Современные биология и биохимия интенсивно используют методы, основанные на рекомбинантной ДНК.

Достижения в области молекулярной биологии существенно повлияли на современную медицину: они не только углубили знания о причинах многих болезней, но и способствовали разработке новых подходов в их диагностике и лечению.

С помощью генной терапии оказалось возможным вводить в организм больного полноценно работающие гены и таким образом восстанавливать метаболические нарушения, вызванные мутантными генами. Таким путём осуществляется лечение детей с иммунодефицитом, вызванным дефектом аденозиндезаминазы, в стадии клинических испытаний находятся методы гено-коррекции таких наследственных болезней, как семейная гиперхолестеринемия, гемофилия В, муковисцидоз и некоторые другие.

Глоссарий терминов по ДНК-технологии

А

Авторадиограмма – фотографический отпечаток, фиксирующий расположение фракций ДНК, полученных в результате электрофореза и гибридизовавшихся с радиоактивно меченым зондом. Получают путем наложения чувствительной к радиоактивному излучению фотопленки на нитроцеллюлозную мембрану, полученную после Саузерн-блот гибридизации.

Аллель – альтернативная форма гена, занимающая тот же генетический локус на хромосоме.

Антикодон – группа из трёх оснований, занимающая фиксированное положение в транспортной РНК, которая комплементарна кодону в информационной (матричной) РНК.

Б

Бактериофаг – вирус, поражающий определенный тип бактерий. Общее название вирусов, инфицирующих бактерии – фаги (бактериофаги).

Банк генов (gene bank) – набор генов данного организма, полученный на основе рекомбинантных.

Библиотека генов (gene library) – коллекция произвольно клонированных фрагментов геномной ДНК организма или специальный набор фрагментов ДНК, представляющих, например, коллекцию иРНК, экспрессирующуюся в клетке в определенное время.

Блоттинг (blotting – промакивание) – этап процесса Саузерн-блот гибридизации, в результате которой весь электрофоретический спектр ДНК отпечатывается (blotting) за счет капиллярных сил на приложенной к гелю нитроцеллюлозной мембране (пленке), после чего фиксируется при помощи высокой температуры.

В

Вектор, переносчик – молекула ДНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках различных организмов, включать в себя чужеродную ДНК и обеспечивать размножение (клонирование) и работу (экспрессию)

встроенного в неё искусственно какого-либо гена. Является инструментом генной инженерии, обеспечивающим доставку (перенос) генетической информации в клетку-реципиент и ее клонирование.

Величина генома (genome size) – количество пар оснований (п. о.) в расчете на гаплоидный геном .

Вирусы – формы внеклеточной жизни, которые состоят из ДНК (ДНК- вирусы: аденовирусы, бакуловирусы, геминивирусы и др.) или РНК (РНК- вирусы: бромовирусы, ретровирусы и др.) и белковой оболочки.

Вырожденность кода – в молекулярной биологии генетический код является вырожденным, поскольку одна аминокислота кодируется более чем одним нуклеотидным триплетом, кодоном. Например, тирозин кодируется двумя триплетами УАУ и УАЦ, а лейцин может кодироваться даже шестью.

Г

Д-галактозидаза (D-galactosidase) – фермент, который катализирует расщепление лактозы на глюкозу и галактозу. У *E. coli* Д-г. является тетрамером, кодируемым lac-Z-геном, размером 5000 Д. Д-г. относится к группе адаптивных ферментов, т. е. его синтез возможен только при наличии субстрата (лактозы) во внешней среде.

Гель – желеобразный матрикс, состоящий из полимерного компонента и буферного раствора, используется для разделения в процессе электрофореза макромолекул ДНК (агарозный Г.), РНК (агарозный, полиакриламидный Г.) или белков (полиакриламидный или крахмальный, Г.).

Ген – основная физическая и функциональная единица наследственности, несущая информацию от одного поколения к другому. Ген представляет собой специфическую последовательность нуклеотидов в ДНК, а у некоторых вирусов – в РНК, детерминирующих или нуклеотидную последовательность транспортных РНК (тДНК), или рибосомных РНК (рДНК), или последовательность аминокислот в белках.

Ген устойчивости – ген, кодирующий белок, который катализирует разрушение токсина. Г. у. часто используется в векторах клонирования для облегчения отбора трансформантов (напр., ген антибиотикоустойчивости и др.).

Генетическая инженерия – наука о генетическом конструировании, направленная на создание новых форм биологически активных ДНК и генетически новых форм клеток и целых организмов с помощью искусственных приемов переноса генов (технологии рекомбинантных ДНК, генетической трансформации, гибридизации клеток).

Генетические карты – карты линейного расположения генов на хромосоме (группы сцепления), выявленные в экспериментах по генетическим рекомбинациям, а также распределение генов по разным хромосомам, как правило, с указанием генетического расстояния между ними.

Генетический код – система записи наследственной информации в молекулах нуклеиновых кислот, основанная на определенном чередовании последовательностей нуклеотидов в ДНК или РНК, образующих кодоны соответствующих аминокислот белков. Каждый кодон кодирует одну молекулу аминокислоты.

Геном (genom) – совокупность генов, характерных для гаплоидного набора хромосом данного вида организмов. Основной гаплоидный набор хромосом.

Геномная библиотека (genomic library) – набор клонированных. Клонирование) фрагментов ДНК, представляющих индивидуальный (видовой) геном. У млекопитающих (в т. ч. у человека) геномы крупные, поэтому для них обычно создают хромосомные библиотеки.

Гибридная (рекомбинантная) ДНК – новая последовательность ДНК, образованная *in vitro* путем лигирования двух или более негомологичных молекул ДНК. Например, рекомбинантная плазмида, содержащая одну или более вставок чужеродной ДНК, которые включены в сайт клонирования или в полилинкер.

Д

Двухцепочная молекула кДНК – комплементарная ДНК.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – высокомолекулярный полимер, состоящий из четырех дезоксирибонуклеотидов (А, Т, Ц, Г), а периодическим чередованием которых кодируется генетическая информация вирусов, бактерий и высших организмов. ДНК способна к самоудвоению, что обеспечивает генетическую приемственность между поколениями в процессе размножения. Нарушение последовательностей нуклеотидов в цепи ДНК приводит к наследственным изменениям – мутациям.

Денатурация ДНК – представляет собой процесс разъединения двойной спирали нуклеиновых кислот на комплементарные одноцепочечные нити под действием физических и химических факторов (температуры, давления, pH и др.).

ДНК-ДНК гибридизация (DNA-DNA hybridization) – процесс образования двухцепочечной ДНК из двух комплементарных одонитчатых молекул ДНК.

ДНК-лигаза – фермент, который катализирует образование фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами в молекуле ДНК.

ДНК-зонд (проба) – определенная (известная) радиоактивно- и нерадиоактивно меченая последовательность нуклеиновой кислоты, используемая в молекулярном клонировании для идентификации специфических молекул ДНК, имеющих комплементарные последовательности. Для этого используется радиоавтография или к.-л. др. система детекции (обнаружения) нерадиоактивно меченого зонда.

ДНК-полимеразы (DNA-polymerases) – ферменты, участвующие в синтезе ДНК. У *E. coli* были выделены 3 типа ДНК-п.: pol I, pol II и pol III. Pol III является основным ферментом, ответственным за репликацию ДНК в клетке бактерий.

И

Информационная (матричная) РНК (и-РНК, мРНК) – форма РНК, осуществляющая передачу записанной в ДНК информации к местам синтеза белка, состоит из одной цепи, содержит от одной до десяти тысяч пар оснований.

Интроны, интрогенные районы (introns or intragenic regions or intervening sequences) – последовательности нуклеотидов у эукариотических генов, транскрибируемых в про-иРНК, которые затем вырезаются и деградируют в ядре.

Искусственные генетические структуры – целенаправленно сконструированные (созданные) новые формы биологически активных ДНК и генетически новые формы клеток с помощью искусственных приёмов переноса фрагментов ДНК, целых генов или их частей.

In vitro (лат.), "в пробирке" – биологические процессы, смоделированные при их экспериментальном изучении в условиях изоляции от всего (целого) организма, т. е. "в пробирке", напр., культура ткани, фермент-субстратная реакция и т. д.

К

Картирование (mapping) – установление позиций генов или каких-то определенных сайтов вдоль нити ДНК.

Картирование генов (gene mapping) – установление линейной организации генов, определение относительной локализации генов на хромосомах или плазмидах (кольцевая карта сцепления) и относительного расстояния между ними. Генетические карты можно создавать на основе анализа рекомбинаций, принятого в классической генетике, или на основе данных молекулярной генетики, т. е. напрямую используя данные секвенса.

кДНК, комплементарная ДНК (cDNA, complementary DNA) – одно- или двуничатая молекула ДНК, комплементарная молекуле иРНК. Образуется при обратной транскрипции иРНК с помощью обратной транскриптазы in vitro. кДНК соответствует определенному гену без интронов.

Клонирование (cloning or molecular c.) – получение клонов с помощью одного или многих методических приемов. Различают

клонирование генов – выделение и амплификация отдельных генов в реципиентных клетках, а также молекулярное клонирование – размножение молекул ДНК в составе вектора.

Клонирование гена (gene cloning) – использование технологии рекомбинантной ДНК для инсерции (включения) фрагмента ДНК, напр, гена, в клонирующий вектор и размножение этой последовательности путем трансформации вектора в подходящую клетку-хозяина, напр, в клетки кишечной палочки.

Кодон – последовательность из трех соседних нуклеотидов в ДНК или РНК, кодирующая определенную аминокислоту либо начало и конец трансляции, т. е. это дискретная единица генетического кода.

Конкатамер ДНК (DNA concatemer) – структура из нескольких повторяющихся (одна за другой) единиц гена. У некоторых фагов (например, фагХ и Т4) геном во время репликации представлен в виде конкатамерных молекул – больших молекул ДНК, образованных из нескольких tandemно повторяющихся единиц генома.

Конструирование гибридных молекул ДНК – создание новых форм биологически активных ДНК с помощью искусственных приёмов переноса и сшивания различных фрагментов ДНК.

Концевая (терминальная) трансфераза (terminal transferase) – фермент, катализирующий достройку 10–40 дезоксинуклеотид-5'-трифосфатов к 3'-ОН- группам обоих концов двунитчатой ДНК или к однонитчатой ДНК, образуя 3'- гомополимерное удлинение нити (полидезоксиаденилат) и освобождая неорганический пирофосфат. Фермент используется для радиоактивного мечения молекулы ДНК и образования гомополимерных хвостов на 3'-концах ДНК. Т. т. широко используется в технологиях рекомбинантной ДНК.

Космиды – векторная плазмида, содержащая cos-участок (cos-сайт) ДНК фага лямбда, являющийся местом замыкания его линейной формы в кольцо. Благодаря наличию cos-участка космида, включающая чужеродные гены, может быть упакована в головку фага in vitro.

Л

Лигирование (ligation) – 1. Процесс ковалентного соединения двух линейных молекул нуклеиновых кислот посредством фосфодиэфирных связей, осуществляемый с участием фермента лигазы. 2. Прием в генетической инженерии, в ходе которого чужеродная ДНК встраивается между двумя концами плазмидной ДНК с помощью фермента лигазы.

Лизирование, лизис (lysis) – разрушение/растворение вирусами, клеток хозяина под действием ферментов, содержащихся в лизосомах и выделяемых инфицирующими вирусными частицами, в результате чего в среду высвобождается новое потомство вируса.

Липкий конец – термин, относящийся к двунитчатой молекуле ДНК, у которой одна нить длиннее ("выступающая"), чем другая ("заглубленная"). Выступающий участок нити может спариваться с др., комплементарным ему выступающим (липким) концом. Пример: два коротких (12 нуклеотидов) одонитчатых 5'-выступов на каждом конце линейного генома фага лямбда (cos-сайт). Эти Л. к. комплементарны по последовательностям нуклеотидов друг другу и могут спариваться, образуя кольцевую ДНК.

М

Матрица – структура, на основании которой синтезируется новая молекула, например цепь ДНК является матрицей для ее репликации.

Молекулярные шапероны – белки, обслуживающие фолдинг: нуклеоплазмины, белки теплового шока и белки-шапероны.

Н

Нитроцеллюлозная (пленка) мембрана – состоит из нитроцеллюлозных нитей, образующих поры определенного размера (0,45 мкм). Селективно (выборочно) улавливают двунитчатую ДНК или ДНК-РНК-гибриды, но свободно пропускают одонитчатые молекулы. Одонитчатые ДНК и РНК также могут задерживаться на Н. м., если ее проинкубировать при 80 °С в

течение 2 ч (спекание). Такие блоты (пленки) используются в Саузерн- и Нозерн-блот экспериментах.

Нозерн-блот – электрофорез РНК, перенос ее на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану и выявление фрагмента РНК с помощью меченой кДНК, комплементарной экспрессируемой мРНК.

О

Обратная транскриптаза, РНК-зависимая ДНК-полимераза, ревертаза (reverse transcriptase, RNA-dependent DNA-polymerase) – ретровирусный многофункциональный фермент класса трансфераз, синтезирующий двунитчатую ДНК с использованием в качестве матрицы одонитчатой РНК.

П

Плазмиды – внехромосомный (экстрахромосомный) генетический элемент, кольцевая, автономно реплицирующаяся дуплексная молекула ДНК, имеющая размеры от 1 до 200 и более кб и от одной до нескольких сот копий на бактериальную клетку. Число копий П. может зависеть от факторов среды. П. обычно придают селективные преимущества клетке хозяина (напр., устойчивость к антибиотикам).

Полилинкер, сайт множественного клонирования (polylinker or multiple cloning site) – синтетический двунитчатый олигонуклеотид, содержащий много сайтов рестрикции. П. вводят в векторы, чтобы расширить их возможности для клонирования чужеродных ДНК в любом из этих сайтов.

Праймер, затравка (primer) – короткий олигонуклеотид ДНК или РНК, комплементарный участку более длинной молекулы ДНК или РНК. К его 3'-ОН-концу ДНК-полимераза может добавлять нуклеотиды в растущую цепь ДНК в 5'-3'-направлении.

Принцип комплементарности – пространственная взаимодополняемость (взаимное соответствие) поверхностей взаимодействующих молекул или их частей, приводящая, как правило, к образованию вторичных (Ван-дер-Вальсовых, водородных, ионных) связей между ними.

Полимеразная ценная реакция, ПЦР (polymerase chain reaction, PCR) – процесс амплификации *in vitro*, при котором фрагмент ДНК длиной до 15 кб может быть амплифицирован (размножен) до 10^8 раз (копий).

Р

Репликация – процесс точного самовоспроизведения молекул нуклеиновых кислот, сопровождающийся передачей точных копий генетической информации в ряду поколений.

Репортерный ген (reporter gene) – ген, хорошо изученный генетически и биохимически, который легко может быть сшит с регуляторной областью др. генов. Его активность в норме не обнаруживается в организме, в который этот ген переносится.

Рестриктазы – ферменты рестрикции, разрезающие ДНК по определенным нуклеотидным последовательностям, называемым сайтами рестрикции.

Рестрикционные карты – диаграмма расположения на молекуле ДНК сайтов узнавания рестриктазами.

Реципиентный организм, реципиент – 1. Любая клетка или организм, получающий: а) новую генетическую информацию в форме чужеродной ДНК или РНК; б) к.-л. биологический материал от др. организма-донора. 2. Клетка, принимающая генетический материал при трансдукции и конъюгации.

Ровные (тупые) концы – термин, относящийся к двухцепочечным фрагментам ДНК у которых ни одна нить на концевых участках не выступает за другую в отличие от липких концов.

Рибонуклеиновая кислота (РНК) – чаще всего однонитчатый полинуклеотид, характеризующийся наличием в нем сахара рибозы и урацила (вместо дезоксирибозы и тимина в ДНК). Обеспечивает передачу генетической информации (информационная иРНК и транспортная тРНК), служит в качестве структурного каркаса для рибосом (рибосомная рРНК) и выполняет ферментативные функции (рибозимы).

Рибосома – органоид клетки, с помощью которого осуществляется биосинтез белка.

С

Сайт клонирования – место (сайт) расщепления ДНК определенной рестриктазой в векторе клонирования, которое локализовано в пределах одного из генов устойчивости. Это позволяет обнаруживать инсерцированную чужеродную ДНК по исчезновению устойчивости к антибиотику на селективной среде в процессе клонирования.

Сайт рестрикции – последовательность пар оснований в молекуле ДНК, в месте расположения которой определенная рестрикционная нуклеаза разрезает (расщепляет) ее.

Сайт узнавания – специфическая последовательность ДНК, с которой связываются рестрикционные эндонуклеазы, а также начинается расщепление молекулы ДНК данным ферментом. Для каждой рестриктазы имеется собственная специфическая последовательность узнавания. Обычно С. у. представлен коротким палиндромом.

Cos-сайты (cos-sites) – одностранные, комплементарные участки на обоих концах ДНК фага лямбда, состоящие из 12 нуклеотидов. Обеспечивают фагу образования кольцевых структур путем соединения водородными связями комплементарных концов и упаковку ДНК в фаговые частицы. С. cos используются для конструирования космид.

Самостоятельная репликация – способность ряда внехромосомных генетических элементов (плазмид) к автономной репликации.

Саузерн-блот анализ – анализ молекул ДНК и их фрагментов при помощи метода блот-гибридизации по Саузерну.

Саузерн-блот гибридизация – метод, позволяющий идентифицировать конкретные гены и другие рестрикционные фрагменты ДНК после их электрофоретического разделения.

Светящиеся фракции ДНК – двунитчатые фракции ДНК в агарозном или полиакриламидном геле, окрашенные красителем этидий бромидом, в комплексе с которым приобретают малиновую окраску при УФ освещении.

Секвенирование ДНК (DNA sequencing) – метод определения последовательности оснований в молекуле ДНК. Существует несколько методов секвенирования: автоматическое,

химическое, прямое, секвенирование по Максаму-Гилберту, Сэнгеру и др.

Секвенирование ДНК по Максаму-Гилберту, химический метод (Maxam- Gilbert sequencing or chemical s.) – один из наиболее распространенных методов определения первичной последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК.

Секвенирование ДНК по Сэнгеру, ферментативный метод (Sanger sequencing or enzymatic method s.) – техника секвенирования однонитчатой ДНК. В основе метода – присоединение к однонитчатой ДНК-матрицы секвенирующего праймера (обычно синтетических олигонуклеотидов).

Скрининг – поиск в геной библиотеке клонов конкретной колонии, содержащей нужный фрагмент чужеродной ДНК.

Создание рекомбинантных ДНК – конструирование новых последовательностей ДНК, образованных *in vitro* путем сшивания двух или более негомологичных молекул ДНК.

Стоп-кодон, нонсенс-к., терминатор – тринуклеотид в информационной РНК, сигнализирующий об окончании синтеза полипептида и освобождении полной полипептидной цепи от рибосомы.

Т

Таблица (словарь) генетических кодов, с. кодонов (genetic code table (dictionary)) – таблица, включающая генетические значения отдельных кодонов или триплетов соответственно продуктам их функционирования.

Тандемный повтор (tandem repeat) – организация двух или более расположенных рядом одинаковых последовательностей в пределах двунитчатой молекулы ДНК.

Транскрипция – синтез молекул РНК на ДНК- или РНК-матрице, осуществляемый ДНК-зависимой или РНК-зависимой РНК-полимеразой. Т. – первый этап реализации генетической информации, записанной в ДНК, осуществляемый с участием фермента РНК-полимераза у прокариот и не менее 3 типов РНК-полимераз, транскрибирующих гены у эукариот.

Трансляция – считывание (декодирование) информационной РНК, рибосомами и транслирование этого кода в белок.

Транспортная РНК (т-РНК) – низкомолекулярная РНК (содержит 75–90 нуклеотидов), обеспечивающая перенос аминокислот к рибосомам для включения их в белки.

Трансформация – 1. Перенос генетической информации в бактериальные клетки при помощи изолированной ДНК с участием или без участия плазмид, но всегда без участия вирусов. 2. Направленная модификация генома клетки с помощью очищенной или рекомбинантной ДНК из клетки др. генотипа, которая интегрирует (поглощается) в геном модифицируемой клетки. 3. Изменение морфологии клетки или других ее характеристик (напр., неопластического роста и др.), происходящее после интеграции нуклеиновой кислоты от онкогенных вирусов в клеточный геном, после воздействия хими-ческими канцерогенами или спонтанно (онкогенная Т.). 4. Изменение наследственных свойств клетки в результате проникновения в нее чужеродной ДНК.

Трансгенные организмы – организмы, в наследственные структуры которых искусственно введен хотя бы один активно функционирующий ген от другого организма.

Трансформированные организмы – организмы с измененными наследственными свойствами в результате проникновения в них чужеродной ДНК.

Триплет – комбинация из трех последовательно расположенных нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты.

Ф

Фингерпринт ДНК (DNA fingerprint) – высокоспецифичные гибридизационные полосы на электрофореграммах (фингерпринт), образующиеся как результат полиморфизма длины рестрикционных фрагментов геномной ДНК.

Фракции гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом – часть молекул ДНК, которые после электрофоретического фракционирования комплементарно связались с радиоактивным зондом в процессе Саузерн-блот гибридизации.

Х

Химерные плазмиды – плазмиды содержащие вставку (фрагмент) чужеродной ДНК.

Хромосомная библиотека (chromosome specific library) – один из видов геномной библиотеки используемый для анализа геномов больших размеров, напр. человека. Х. б. создают клонированием фрагментов ДНК индивидуальных гомологичных хромосом.

Ч

Чужеродная ДНК – ДНК какого-либо организма по отношению к организму-реципиенту.

Э

Экзоны (exons) – последовательности эукариотных генов, которые, как правило, сохраняются при процессинге про-иРНК и образуют зрелую матричную, или информационную РНК.

Экспрессия гена – реализация генетической информации, закодированной в ДНК, путем ее транскрипции и трансляции иРНК.

Электрофорез в агарозном геле — Метод разделения заряженных биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот и т. д.) в электрическом поле, базирующийся на их различии по электрическому заряду, форме и размеру.

Электрофоретическая камера – часть прибора для проведения электрофореза. Различают вертикальную и горизонтальную Э.к.

Элонгация (elongation) – удлинение нуклеотидной цепи путем добавления новых нуклеотидов (ДНК- или РНК-синтез) или аминокислотной цепи путем присоединения аминокислот.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Альбертс Б., Льюис Д. и др. Молекулярная биология клетки. – М.: Мир, 1994. – 517 с.
2. Азимов А. Генетический код. От теории эволюции до расшифровки ДНК. – М.: Центрополиграф, 2006. – 203 с.
3. Абрамова З. И. Введение в генетическую инженерию: Уч. пособие. – Казань: Казанский университет, 2008. – 169 с.
4. Баранова Е. Код ДНК. – М.: Астрель-СПб, 2007. – 222 с.
5. Баранов В. С., Хавинсон В. Х. Определение генетической предрасположенности к некоторым мультифакторным заболеваниям. Генетический паспорт / Под ред. В. Х. Хавинсон. – С-Пб.: ИКФ-«Фолиант», 2001. – 48 с.
6. Б. Глик., Дж. Пастернак // Молекулярная биотехнология. – М.: 2002.
7. Бокуть С. В., Герасимович Н. В., Милютин А. А. Молекулярная биология. 2005.
8. Вир С. Клонирование человека: Аргументы в защиту. – М.: Медицина, 2002.
9. Висенс А. Природа сама решила поставить запрет на клонировании. // Nature, vol 407, p 318.
10. Ванюшин Б. Ф. Энзиматическое метилирование ДНК – эпигенетический контроль за генетическими функциями клетки. // Биохимия. – 2005. Т. 70, № 5. – С. 598–611.
11. Валиханова Г. Ж. Биотехнология растений – Алматы: 2002. – 350 с.
12. Геномика – медицине /Под ред. В. И. Иванова и Л. Л. Киселева. – М.: Академкнига, 2005. – 392 с.
13. Глазко В. И., Глазко Г. В. Введение в ДНК-технологии и биоинформатику. – К.: Нора-принт, 2001. – 543с.
14. Глазко В. И., Дунин И. М., Глазко Г. В., Калашникова Л. А. Введение в ДНК-технологии – М.: Росинформмагротех, 2001. – 436 с.
15. Гончаренко Г. Г. Основы генетической инженерии. – Минск: Высш. шк., 2005.

16. Горбунов Ю.А., Медведев Г.Ф., Минина Н.Г. Основы генетической инженерии и биотехнологии: Учебник – Минск: ИВК 2016. – 344с.
17. Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Биология: В 3-томах; *Под ред. Р. Сопера. –М.: БИНОМ-Лаборатория знаний, 2014. –454 с.
18. Генетика. Учебник для вузов /Под ред. акад. РАМН В. И. Иванова. – М.: 2006. –638 с.
19. Дерфлер В. О биологическом значении метилирования ДНК./ Биохимия. 2005. –С. 70, 618–640.
20. Жимулёв И. Ф. Общая и молекулярная генетика / Под ред. Е. С. Беляева, А. П. Акифьева. –Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003. –479 с.
21. Кемп П., Армс К. Введение в биологию / П.Кеип, К. Армс. – М.: Мир. 2008, – 671 с.
22. Конищев А. С., Севастьянова Г. А. Молекулярная биология. – М.: Академия, 2003.
23. Льюин Б. Гены. –М: пер. 9-го англ. изд. – 2011. –896 с.
24. Мушкетаров Н. Н., Кузнецов С. Л. Молекулярная биология, 2007.
25. Новиков П. В., Вельтищев Ю. Е. Роль наследственности в патологии детского возраста: методы диагностики, терапии, профилактики. –М.: 2004. – 207 с
26. Олескин А. В. Биополитика – М, 2001.
27. Патрушев Л. И. Генная и белковая инженерия, 2004.
28. Ратнер В.А. Генетический код как система. – М.: 2000.
29. Смирнов Ю. Дорога к бессмертию. –Ярославль: Наука, 2001.
30. Фросин В. Н. Введение в биологию человека – Казань: Диалог – Компьютерс, 2007. – 277 с.
31. Харченко П. И., Глазко В. И. ДНК-технологии в развитии аргробиологии. – М.: Воскресенье, 2006., –480 с.
32. Чизмаджев Ю. А. Перенос нуклеиновых кислот в ткани и клетки (на пути к генной терапии) // СОЖ. –2004. Т. 8, № 2. –С. 24–29.
33. Шерстнев К. И., Комаров А. Н. Химия и биология нуклеиновых кислот. –М.: 2000.

- 34.Щелкунов С. Н. // Генная инженерия. –Новосибирск, 2004.
- 35.Журнал Nature № 334. Карта хромосомы. 2006.
- 36.Baranova H. Nos genes, notre sante et nous. Armand Colin, 2004 Book, French.
- 37.Bantounas I., Phylactou L. A., Uney J. B. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems // J. Mol. Endocrinology. –2004. –Vol. 33. – P. 545–557.
- 38.Bishop T., Sham P. Analyses of multifactorial disease. BIOS Scientific Publishers Ltd 2000, Eng.
- 39.Buchsachner G. L., Wong-Staal F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases // Blood. –2000. –Vol. 95. –P. 2499–2504.
- 40.Hu W.-S., Pathak V. K. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy // Pharmacol. Rev. –2000. –Vol. 52. –P. 493–511.
- 41.Jen K.-Y., Gewirtz A. M. Suppression of gene expression by targeted disruption of messenger RNA: available options and current strategies // Stem cells. – 2000. –Vol. 18. –P. 307–319.
- 42.Leiden J. M. Human gene therapy: the good, the bad, and the ugly // Circ. Res. –2000. –Vol. 86. –P. 923–925.
- 43.Lever A.M.L. Gene therapy for HIV // Sex. Transm. Inf. –2001. –Vol. 77. –P. 93–96.
- 44.Liang L., Liu D.-P., Liang C.-C. Optimizing the delivery systems of chimeric RNA-DNA oligonucleotides // Eur. J. Biochem. –2002. –Vol. 269. –P. 5753–5758.
- 45.Lim M. S., Elenitoba-Johnson K.S.J. The molecular pathology of primary immunodeficiencies // JMD. –2004. –Vol. 6. –P. 59–83.
- 46.Marteau T and Richards M. The troubled helix. Social and psychological impacts of the new human genetics. Cambridge University Press. Eds 2000, Eng.
- 47.Malcolm S. & Goodship J. Genotype to Phenotype. Second edition. BIOS Scientific Publishers Limited 2001.
- 48.Michael M. Vilenchik and Alfred G. Knudson, Jr. Inverse radiation dose-rate effects on somatic and germ-line mutations and DNA damage rates. PNAS May 9, 2000, vol. 97 no. 10 5381–5386

49. Milhavet O., Gary D. S., Mattson M. P. RNA interference in biology and medicine // *Pharmacol. Rev.* –2003. –Vol. 55. –P. 629–648.

50. Relph K., Harrington K., Pandha H. Recent developments and current status of gene therapy using viral vectors in UK // *BMJ.* –2004. –Vol. 329. –P. 839–842.

51. Richardson P. D., Augustin L. B., Kren B. T., Steer C. J. Gene repair and transposon-mediated gene therapy // *Stem cells.* –2002. –Vol. 20. –P. 105–118.

52. Seidman M. M., Glazer P. M. The potential for gene repair via triple helix formation // *J. Clin. Invest.* –2003. –Vol. 112. –P. 487–494.

53. Selkirk S. M. Gene therapy in clinical medicine // *Postgrad. Med. J.* –2004. –Vol. 80. –P. 560–570.

54. Sullenger B. A. Targeted genetic repair: an emerging approach to genetic therapy // *J. Clin. Invest.* –2003. –Vol. 112. –P. 310–311.

55. Young L. S., Mautner V. The promise and potential hazards of adenovirus gene therapy // *Gut.* –2001. –Vol. 48. –P. 733–736.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. Современное состояние и основные направления развития ДНК-технологий.....	5
1.1. Возникновение, становление и развитие ДНК-технологий.....	5
1.2. Практическое использование ДНК-технологий.....	7
1.3. Основные направления использования ДНК-технологий.....	12
1.4. Современные инновационные проекты ДНК-технологий в животноводстве	14
1.5. Биокomпьютерные технологии	18
1.5.1. ДНК-компьютеры.....	19
1.5.2. Клеточные компьютеры.....	22
2. Определение гена. Строение и функции ДНК	27
2.1. Представление о гене.....	27
2.2. Состав, структура и свойства ДНК.....	32
3. Получение рекомбинантных ДНК.....	36
3.1. Понятие рекомбинантных ДНК.....	36
3.2. Конструирование рекомбинантных ДНК.....	37
3.3. Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК.....	43
3.4. Химерные ДНК против ВИЧ	45
4. Методы клонирования ДНК.....	48
4.1. Биологическая сущность клонирования	49
4.2. Методы клонирования ДНК in vivo.....	50
4.2.1. Геномные библиотеки.....	54
4.2.2. Библиотеки (кДНК).....	55
4.3. Доводы за и против клонирования.....	57
5. Методы репарации ДНК.....	59
5.1. Фотореактивация как основной метод репарации.....	59
5.2. Удаление поврежденного участка ДНК.....	63
5.3. Пострепликативная репарация.....	66
6. Методы репликации ДНК.....	71
6.1. Понятие и основы репликации ДНК.....	71
6.2. Процесс репликации ДНК.....	74

6.3. Основные ферменты репликации.....	79
7.Расшифровка генетического кода человека.....	83
7.1.Понятие генетического кода.....	83
7.2.Свойства генетического кода.....	83
7.3.Генетическая информация.....	85
7.4.Расшифровка генетического кода.....	88
8. ПЦР-диагностика.....	90
8.1.Основной принцип ПЦР.....	91
8.2.Типовые ошибки при диагностике методом ПЦР.....	98
8.3.Преимущества метода ПЦР как метода диагностики инфекционных заболеваний.....	104
8.4.Ограничения метода ПЦР.....	106
9.Метод сохранения генофонда.....	108
9.1.Эффективность и объекты криоконсервации. Температурный режим.....	100
9.2.Криповреждения и криопротекторы.....	110
9.3.Криоконсервация эмбрионов.....	111
9.4.Процедура замораживания и размораживания эмбрионов..	113
9.5.Криоконсервация спермы.....	114
9.6.Криоконсервация ооцитов.....	116
9.7.Экстракорпоральное оплодотворение как метод в биоинженерии.....	120
10.Генная терапия.....	123
10.1.Виды генной терапии.....	124
10.2.Способы введения (доставка) терапевтических конструкций в организм.....	126
10.3.Позитивная генная терапия.....	130
10.4.Негативная генотерапия.....	135
10.5.Генная терапия различных заболеваний.....	142
10.6.Генная терапия наследственных заболеваний.....	149
10.7.Онкологические заболевания.....	157
11.Связь ДНК-технологии с новыми областями исследования.....	166
11.1.Метабомика.....	171
11.2.Биоинформатика.....	174
11.3.Протеомика.....	180
11.4.ДНК экология.....	185

12. Прикладные ДНК-технологии. Достижения и перспективы	187
12.1. Недостатки традиционной селекции и современные ДНК-технологии в их преодолении.....	187
12.2. Скорость распространения ГМО.....	192
12.3. Основные причины распространения гм сортов.....	195
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	206
ГЛОССАРИЙ ТЕРМИНОВ.....	207
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	220

Учебное издание

Искакова Конирша Мырзашевна

ОСНОВЫ ДНК-ТЕХНОЛОГИИ

Учебное пособие

Нач. ОППП РУ ДСО
Редактор
Компьютерная верстка

*З. А. Губайдулина
Г. М. Дюсенбаева
Л. К. Касжанова*

Подписано в печать 13.02.2017 г.

Тираж 300 экз. Формат 60х84 1/16. Бумага типогр. №1.

Объем 14,1 уч.-изд.л. Заказ №792. Цена договорная.

Издание Казахского национального исследовательского
технического университета им. К.И. Сатпаева

Департамент по связям с общественностью КазННТУ

Издательское управление

г. Алматы, ул. Сатпаева, 22

ISBN 978-601-323-055-9

